

DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE ET PRODUCTION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES
CHEZ *FRANKIA* SPP.

par

Jessica Nadeau

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2017

Le 21 mai 2017

*le jury a accepté le mémoire de Madame Jessica Nadeau
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Sébastien Roy
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur François Malouin
Codirecteur de recherche
Département de biologie

Professeur Ryszard Brzezinski
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Sébastien Rodrigue
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Les souches de bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques sont de plus en plus prévalentes dans les hôpitaux et la communauté. La découverte de nouveaux antibiotiques s'avère dès lors primordiale pour combattre ces pathogènes émergents. Plusieurs actinomycètes du sol sont connus pour sécréter des antibiotiques leur permettant de contrecarrer la compétition dans les environnements pauvres en nutriments. De ce fait, ces microorganismes sont régulièrement exploités à l'échelle industrielle pour la production d'antibiotiques ; ces derniers s'avèrent d'une grande importance pour l'industrie pharmaceutique. Chez ces microorganismes, les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques sont souvent reliés.

Malgré leurs applications dans les domaines de l'environnement et de la santé, les actinomycètes du sol appartenant au genre *Frankia* s'avèrent encore aujourd'hui très peu étudiés. Malgré tout, plusieurs antibiotiques ont déjà été caractérisés chez le genre *Frankia* et des études de protéomique et de génomique ont également démontré la présence de plusieurs ilots de gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse d'antibiotiques chez ces actinomycètes. Par ailleurs, différentes morphologies cellulaires ont été identifiées chez *Frankia* spp. : l'hyphe végétatif, le sporange et la vésicule. Chez *Frankia alni* ACN14a, une quatrième morphologie cellulaire est parfois observée au laboratoire, il s'agit du *Reproductive torulose hyphae* (RTH). L'apparition sporadique de cette morphologie cellulaire dans différentes conditions de culture suggère qu'elle fait partie intégrante du cycle de vie chez cette souche. Au laboratoire, plusieurs milieux permettant une différenciation cellulaire massive vers l'hyphe toruleux chez *Frankia alni* ACN14a ont été développés. Ces derniers induisaient également la formation massive de sporanges chez une souche présentant une grande similarité génétique : *Frankia* sp. ACN10a.

Vu la fréquence d'un lien existant entre les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques chez les actinomycètes, le projet visait tout d'abord à optimiser la

différenciation cellulaire chez *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a en vue d'obtenir une différenciation cellulaire massive et reproductible. Un criblage pour déterminer l'influence sur la différenciation cellulaire de différents paramètres impliqués dans la préparation de l'inoculum au laboratoire a démontré que le nombre de passages d'une préculture, la densité d'inoculation d'une préculture, l'âge d'un inoculum et le degré d'homogénéisation d'un inoculum influençaient l'état physiologique des cultures de *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a. Selon l'état physiologique de l'inoculum, les cultures subséquentes présentaient ou non la capacité de se différencier et de produire des antibiotiques. Chez *Frankia alni* ACN14a, la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques s'avéraient supérieures lorsque la préculture était passée à une concentration protéique autour de 15 à 20 µg de protéines/ml et homogénéisée avec 10 coups de piston de seringue munie d'une aiguille. Chez la souche *Frankia* sp. ACN10a, la production d'antibiotiques semblait favorisée par un passage plus restreint des cultures, alors que l'obtention de sporange semblait favorisée par un nombre de passages supérieur des précultures.

Par l'entremise d'essais de diffusion en agar, une évaluation du potentiel antimicrobien d'extraits de surnageant a également indiqué une capacité biosynthétique intéressante chez les deux souches à l'étude. Dans certaines conditions, *Frankia alni* ACN14a présentait une activité antibiotique envers plusieurs souches d'importance clinique telles *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Chez la souche *Frankia* sp. ACN10a, l'activité antibiotique semblait plutôt limitée à *P. aeruginosa*. Par ailleurs, plusieurs paramètres impliqués dans la préparation de l'inoculum au laboratoire ont été démontrés comme influençant la capacité de biosynthèse d'antibiotiques chez ces souches. Notamment, l'emploi d'un inoculum âgé de quatre semaines favorisait une activité antibiotique plus diversifiée chez *Frankia alni* ACN14a.

Le lien existant entre les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques a été évalué chez ces deux souches. Tel qu'établi chez plusieurs actinomycètes, les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques semblent partiellement liés chez *Frankia alni* ACN14a. À l'opposé, aucun lien indissociable

entre les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques n'a pu être établi chez *Frankia* sp. ACN10a, malgré la grande proximité génétique chez ces deux souches.

Par ailleurs, une expérience ayant pour but d'optimiser la différenciation cellulaire chez une biomasse non homogénéisée de *Frankia alni* ACN14a a mené à la découverte du rôle important que semble jouer le CO₂ sur le métabolisme de cette souche. Deux expériences subséquentes en bioréacteurs ont permis de constater qu'une présence de CO₂ stimulait la prolifération cellulaire et inhibait la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH chez cette souche. À l'opposé, une inhibition de la prolifération cellulaire en absence de CO₂, chez *Frankia alni* ACN14a, a permis la différenciation cellulaire vers l'hyphe toruleux chez 20 % des cellules à l'échelle de bioréacteur. Malgré ces observations, aucun lien direct entre la concentration en CO₂ et la capacité biosynthétique de composés antibiotiques n'a pu être établi chez *Frankia alni* ACN14a. Toutefois, plusieurs expériences ont démontré que le CO₂ semble occuper un rôle important au niveau du métabolisme chez *Frankia alni* ACN14a et que sa concentration se doit d'être finement régulée pour permettre la différenciation cellulaire à l'échelle de microplaque et de bioréacteur. De façon générale, les travaux effectués ont permis d'une part d'approfondir les connaissances fondamentales sur les actinomycètes appartenant au genre *Frankia*, mais aussi de mettre en évidence un potentiel biosynthétique d'importance envers plusieurs souches bactériennes d'intérêt clinique.

Mots clés : *Frankia* spp., actinomycète, métabolisme, antibiotiques, différenciation cellulaire, *Reproductive torulose hyphae*, « RTH », dioxyde de carbone.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Pr Sébastien Roy, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir fait découvrir l'univers particulier entourant *Frankia*. Son soutien tout au long de ma maîtrise, nos discussions scientifiques et son positivisme contagieux, m'ont permis de grandement développer mon sens critique et de poursuivre mon projet sans relâche ! J'aimerais aussi remercier tout particulièrement mon codirecteur, le Pr François Malouin et mes conseillers, Pr Sébastien Rodrigue et Pr Ryszard Brzezinski pour leur soutien, leurs conseils éclairés et leur grande disponibilité, qui m'ont permis d'avancer dans la bonne direction tout au long de mon projet.

Je tiens également à remercier les Fonds de recherche Nature et technologies du Québec et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour leur soutien financier par le biais de leur bourse de maîtrise en recherche.

Aussi, je tiens à remercier tous mes collègues de laboratoire avec qui j'ai partagé durant ces deux années de maîtrise autant de discussions scientifiques que de fous rires contagieux. Votre sens de l'humour hors du commun, votre positivisme sans égal et vos judicieux conseils ont fait de mes deux années de maîtrise des années exceptionnelles ! Je tiens à remercier ma famille et mes amis qui m'ont toujours encouragé à aller de l'avant et qui n'ont jamais douté une seule fois de mon potentiel de réussite ! Finalement, un merci spécial à mon partenaire de vie, Sébastien Fortin, pour sa patience inconditionnelle, son sens de l'écoute, et ses nombreux encouragements, puis à nos deux chiens, Pico et Bruce sans qui les heures passées à lire des articles et à rédiger mon mémoire par les soirs n'auraient été aussi agréables !

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES	xii
 CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	 1
1.1 Les Actinobactéries	1
1.2 <i>Frankia</i> sp.	2
1.3 Les morphologies cellulaires retrouvées chez <i>Frankia</i> spp.	3
1.3.1 Les hyphes végétatifs.....	3
1.3.2 Les vésicules	5
1.3.3 Les sporanges	6
1.3.4 Les hyphes toruleux	7
1.4 Similitude entre l'hyphe toruleux de <i>Frankia alni</i> ACN14a et les morphologies retrouvées chez <i>Streptomyces</i> sp. et <i>Nocardia</i> sp.	11
1.5 Le métabolisme secondaire	13
1.6 Utilité du métabolisme secondaire dans l'environnement.....	14
1.6.1 Le rôle des antibiotiques dans la compétition inter-espèces	14
1.6.2 Rôle des antibiotiques comme molécules de signalisation	15
1.6.3 Antibiotiques et <i>quorum sensing</i>	16
1.7 Les différentes classes de métabolites secondaires	17
1.8 La course aux antibiotiques.....	18
1.9 Le lien entre la différenciation cellulaire et la production de métabolites secondaires	20
1.10 Les antibiotiques potentiellement produits chez <i>Frankia</i> sp.....	22

1.11 Gènes surexprimés lors de la différenciation cellulaire vers le morphotype toruleux chez <i>Frankia alni</i> ACN14a	24
1.12 Hypothèses et objectifs du mémoire	27

CHAPITRE 2: ÉTUDE DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE ET DU MÉTABOLISME SECONDAIRE CHEZ *FRANKIA* SPP..... 29

2.1 Mise en contexte	29
2.2 Matériel et méthodes	30
2.2.1 Souches bactériennes utilisées	30
2.2.2 Maintien des cultures et préparation des inocula	30
2.2.3 Inoculation des milieux inducteurs et non inducteurs	31
2.2.4 Suivi des cultures et traitement des échantillons.....	32
2.2.5 Concentration des surnageants.....	33
2.2.6 Antibiogrammes par la technique de diffusion en agar	33
2.2.7 Nombre de passages et concentration protéique des précultures (Paramètre A)..	36
2.2.8 Absence d'homogénéisation de l'inoculum (Paramètre B).....	37
2.2.9 Concentration protéique d'une préculture et degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue (Paramètre C)	39
2.2.10 Âge de l'inoculum (Paramètre D)	40
2.3 Résultats	41
2.3.1 Optimisation de la méthode d'induction de la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH chez <i>Frankia</i> sp.....	41
2.3.1.1 Effet du nombre de passages et de la concentration protéique des précultures chez <i>Frankia alni</i> ACN14a et <i>Frankia</i> sp. ACN10a (Paramètre A)	41
2.3.1.2 Effet d'une absence d'homogénéisation de l'inoculum chez <i>Frankia alni</i> ACN14a et <i>Frankia</i> sp. ACN10a (Paramètre B)	49
2.3.1.3 Effet de la concentration protéique d'une préculture et du degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue chez <i>Frankia alni</i> ACN14a (Paramètre C)	51
2.3.1.4 Effet de l'âge de l'inoculum chez <i>Frankia alni</i> ACN14a (Paramètre D)	52
2.3.2 Évaluation du potentiel antimicrobien chez <i>Frankia</i> sp.	53

2.3.2.1 Effet du nombre de passages et de la concentration protéique des précultures (Paramètre A)	53
2.3.2.2 Effet d'une absence d'homogénéisation de l'inoculum chez <i>Frankia alni</i> ACN14a et <i>Frankia</i> sp. ACN10a (Paramètre B)	63
2.3.2.3 Effet de la concentration protéique d'une préculture et du degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue chez <i>Frankia alni</i> ACN14a (Paramètre C).....	65
2.3.2.4 Effet de l'âge de l'inoculum chez <i>Frankia alni</i> ACN14a (Paramètre D)	65
2.3.3 Évaluation du lien entre la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques chez <i>Frankia</i> sp.	69

CHAPITRE 3: OPTIMISATION DES MÉTHODES D'INDUCTION DE LA DIFFÉRENCIATION CHEZ *FRANKIA ALNI* ACN14A À L'ÉCHELLE DE BIORÉACTEUR.71

3.1 Mise en contexte	71
3.2 Matériel et méthodes	72
3.2.1 Méthode de criblage en plaque 96 puits.....	72
3.2.2 Évaluation de la respiration cellulaire par l'addition du réactif MTS/PMS	73
3.2.3 Mise en culture de <i>Frankia alni</i> ACN14a à l'échelle de bioréacteur 2,2 l	73
3.2.4 Suivi des cultures et induction de la différenciation cellulaire RTH	74
3.3 Résultats	76
3.3.1 Criblage de fortes concentrations d'agents inducteurs.....	76
3.3.2 Induction de la différenciation cellulaire via une élimination progressive du CO ₂ (fermentation 1)	78
3.3.3 Induction de la différenciation RTH via une limitation de l'apport initial en CO ₂ (fermentation 2)	81

CHAPITRE 4: DISCUSSION..... 84

4.1 Optimisation de la méthode d'induction de la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH chez <i>Frankia</i> sp.	84
4.2 Évaluation du potentiel antimicrobien chez <i>Frankia</i> sp.	89
4.3 Évaluation du lien entre la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques chez <i>Frankia</i> sp.....	96

4.4 Implication du CO ₂ dans les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques	99
CHAPITRE 5: CONCLUSION	104
ANNEXE.....	109
BIBLIOGRAPHIE	110

LISTE DES ABRÉVIATIONS

-	moins
%	pourcentage
β	bêta
γ	gamma
>	plus grand que
°C	degré Celsius
~	environ
+	plus
μg	microgramme
μg/ml	microgramme par millilitre
μl	microlitre
μm	micromètre
30S	sous-unité ribosomique 30S
50S	sous-unité ribosomique 50S
70S	ribosome procaryote
ACN10a	<i>Frankia alni</i> ACN10a
ACN14a	<i>Frankia alni</i> ACN14a
ADN	acide désoxyribonucléique
AHL	L-homosérine lactone
ARN	acide ribonucléique
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
dDTP	thymidine diphosphate
DMSO	diméthylsulfoxyde
g	gramme
g/l	gramme par litre
G-2A	analogue du composé G-2N
G-2N	méthyl-2 tétrahydroxy-4,7,9,12 dihydro-5,6 benzo[a]naphtacènedione-8,13
i.e.	c'est-à-dire

IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IM-2	<i>[(2R,3R,10R)-2-10-hydroxybutyl-3-hydroxymethyl g-butanolide]</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
l	litre
l/min	litre par minute
M	molaire
MDR	multirésistant aux antibiotiques
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
mRNA	acide ribonucléique messager
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
MTS/PMS	solution de MTS et de PMS
N	normal
nm	nanomètre
PDR	« pan-résistant » aux antibiotiques
pH	potentiel hydrogène
PMS	phénazine méthosulfate
PQS	<i>pseudomonas quinolone signal</i>
RPM	rotations par minute
RTH	<i>Reproductive torulose hyphae</i> (hyphe toruleux)
SB	<i>sheep blood</i>
SCB1	<i>[(2R,3R,10R)-2-(10-hydroxy-6-methylheptyl)-3-hydroxymethylbutanolide]</i>
sp.	espèce
spp.	espèces (ensemble des)
tRNA	acide ribonucléique de transfert
x g	force « g »
x	fois

LISTE DES TABLEAUX

1. Comparaison du potentiel antimicrobien des phases aqueuses de surnageant de cultures d'ACN14a dans différentes conditions de culture envers <i>E. coli</i> MC4100 <i>imp4213</i> lorsque la préculture était repiquée à une concentration protéique approximative.....	56
2. Évaluation du lien entre la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques chez <i>Frankia</i> spp.....	70
3. Paramètres employés pour la croissance d'ACN14a en bioréacteur 2,2 l.....	74
4. Ensemble des interventions pratiquées sur le bioréacteur 1.	76
5. Ensemble des interventions pratiquées sur le bioréacteur 2.	76

LISTE DES FIGURES

1. Les hyphes végétatifs retrouvés chez <i>Frankia alni</i> ACN14a.	4
2. Les vésicules retrouvées chez <i>Frankia</i> spp.	5
3. Sporange de <i>Frankia</i> spp.....	7
4. Les hyphes toruleux retrouvés chez <i>Frankia</i> spp.	9
5. Les principales cibles antibiotiques.....	20
6. Schéma expérimental ayant permis d'évaluer l'effet, sur la différenciation en RTH, du nombre de passage des précultures et de la concentration protéique à laquelle les précultures sont repiquées (Paramètre A).	37
7. Schéma expérimental ayant permis d'évaluer l'effet de l'absence d'homogénéisation d'un inoculum sur la différenciation en RTH (Paramètre B).....	38
8. Schéma expérimental ayant permis d'évaluer l'effet, sur la différenciation en RTH, de la concentration protéique d'une préculture et du degré d'homogénéisation d'un inoculum à la seringue (Paramètre C).	40
9. Observations microscopiques des pourcentages de viabilité et de RTH chez des cultures d'ACN14a dont la préculture était inoculée à une concentration protéique approximative.....	42
10. Morphologies cellulaires observées chez la souche ACN14a après 14 jours d'incubation en milieux BAPS, BAPS KH ₂ PO ₄ 50 mM pH 5,85, BAPS KCl 40 mM pH 5,85 et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7, lorsque la préculture était inoculée à une concentration protéique approximative.....	43

11. Observations microscopiques des pourcentages de viabilité et de RTH chez des cultures d'ACN14a dont la préculture avait été inoculée une fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml.	45
12. Morphologies cellulaires observées chez ACN14a et ACN10a lorsque la préculture avait été inoculée une fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml, suivant 54 jours et 30 jours d'incubation dans différentes conditions.	46
13. Pourcentages de viabilité de cultures d'ACN10a dont la préculture avait été inoculée une fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml.	47
14. Observations microscopiques des pourcentages de viabilité et de RTH d'une culture d'ACN14a en milieu BAPS KH ₂ PO ₄ 50 mM pH 5,85, dont la préculture avait été passée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml.	48
15. Morphologies cellulaires observées chez les souches ACN14a et ACN10a lorsque la préculture était inoculée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml.	49
16. Morphologies cellulaires observées chez les souches ACN14a et ACN10a suivant 14 jours d'incubation en milieux BAPS et inducteurs, pour des précultures passées successivement trois fois sans homogénéisation de l'inoculum.	51
17. Pourcentages de viabilité et de RTH observés chez des cultures d'ACN14a en milieu BAPS KH ₂ PO ₄ 50 mM pH 5,85 dont les inocula étaient âgés de 2, 4 et 8 semaines.	53
18. Mesures des diamètres d'inhibition de croissance et apparence des zones d'inhibition de croissance associés aux extraits de surnageant de cultures d'ACN14a dont la préculture avait été repiquée à une concentration protéique approximative.	55
19. Mesures des diamètres d'inhibition de croissance et apparence des zones d'inhibition de croissance associés aux extraits de surnageant de cultures d'ACN14a dont la préculture avait été repiquée à une fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml.	58

20. Mesures des diamètres d'inhibition de croissance et apparence des zones d'inhibition de croissance associés à la phase organique des extraits de surnageant de cultures d'ACN10a dont la préculture avait été repiquée une fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml.	60
21. Mesure des diamètres d'inhibition de croissance et apparence des zones d'inhibition de croissance associées à la phase aqueuse des extraits de surnageant de cultures d'ACN14a, lorsque la préculture était repiquée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml.	62
22. Mesures des diamètres d'inhibition de croissance et apparence des zones d'inhibition de croissance associés à la phase organique des extraits de surnageant de cultures d'ACN14a et d'ACN10a, lorsque la préculture était passée trois fois sans homogénéisation de l'inoculum.....	64
23. Mesures des diamètres d'inhibition de croissance et apparence des zones d'inhibition de croissance associées aux extraits de surnageant de cultures d'ACN14a en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, lorsque l'inoculum était âgé de 2, 4 et 8 semaines.....	68
24. Apparence des hyphes de cultures d'ACN14a non homogénéisées en bordure et en périphérie de la plaque 96 puits en présence de 70 mM de KH_2PO_4 , et effet de bordure observé suivant la révélation de la plaque à l'aide du réactif MTS.....	78
25. Suivi du bioréacteur 1 en cours de fermentation.	80
26. Apparence des hyphes d'ACN14a aux jours 10, 13, 14, 16 et 20 en cours de fermentation 1.....	80
27. Suivi du bioréacteur 2 en cours de fermentation.	82

28. Apparence des hyphes d'ACN14a aux jours 6 et 9, 14, 16 et 17 en cours de fermentation 2	83
---	----

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Les Actinobactéries

Les actinobactéries (i.e. actinomycètes) appartiennent à l'ordre des actinomycétales, ce dernier comprenant quatorze sous-ordres, quarante-neuf familles et plus de cent quarante genres (Lechevalier et Lechevalier, 1989; Mobolaji Felicia Adegboye, 2012; Ors *et al.*, 1984). Ces bactéries à Gram positif sporulantes sont caractérisées par un ADN riche en guanine et en cytosine (Chaudhary *et al.*, 2013). Elles sont largement distribuées dans la nature, le sol et les sédiments marins en sont particulièrement riches (Baltz, 2008; Mobolaji Felicia Adegboye, 2012). Le genre *Streptomyces* est le plus grand représentant parmi les actinomycètes du sol, mais des actinomycètes des genres *Norcardia*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium* et *Frankia* ont également été isolés (Benson et Silvester, 1993; Mobolaji Felicia Adegboye, 2012). Plusieurs actinobactéries du sol sont connues pour sécréter des métabolites secondaires dont, entre autres, les antibiotiques (Davies, 2007). Ces derniers sont d'une grande importance économique et sont très prisés par l'industrie pharmaceutique (Craney *et al.*, 2012; Davies, 2007; Malik, 1980; Mobolaji Felicia Adegboye, 2012; Sengupta *et al.*, 2013). À ce jour, près de 80 % des antibiotiques disponibles sur le marché proviennent des actinomycètes (Kumar *et al.*, 2010) et les *Streptomyces* spp. sont très exploités à l'échelle industrielle pour de telles productions (Chaudhary *et al.*, 2013; Rabyk *et al.*, 2014; Udway *et al.*, 2011). Les classes d'antibiotiques produits sont diverses ; les aminosides, les glycopeptides, les ansamycines, les anthracyclines, les β -lactamines, les macrolides, et les tétracyclines sont des classes bien connues; Walsh, 2003). Il est à noter que les propriétés parfois immunosuppressantes, hypocholestérolémiantes, antivirales, antiprotozoaires, anti-VIH, antihelminthes et antitumorales des antibiotiques augmentent d'autant plus leur pertinence clinique (Vaishnav et Demain, 2011).

1.2 *Frankia* sp.

Parmi la famille des actinobactéries, le genre bactérien *Frankia* reste encore aujourd'hui sous-étudié (Benson *et al.*, 2011). L'absence de méthodes efficaces pour inactiver et compléter des gènes d'intérêts, sa croissance lente, l'obtention de cultures hétérogènes et le manque de connaissance sur le génome de nombreuses souches font de cette bactérie filamenteuse un sujet d'étude fastidieux (Benson *et al.*, 2011). Cette bactérie à Gram positif possède un temps de doublement extrêmement long, allant de 15h à 48h, mais pouvant s'étirer sur plusieurs semaines (Benson et Silvester, 1993; Normand *et al.*, 2013). Sur milieu solide, le meilleur temps enregistré pour l'apparition de colonies reste approximativement trois jours, mais peut aller jusqu'à plusieurs semaines, voir plusieurs mois (Benson *et al.*, 2011).

Le genre *Frankia* comprend des bactéries à Gram positif, aérophiles à microaérophiles et caractérisées par un matériel génétique riche en guanine et en cytosine (Benson et Silvester, 1993; Normand *et al.*, 2013). Les bactéries mésophiles et chimioorganotrophes qu'il comprend sont non pathogènes pour l'homme et les animaux (Normand *et al.*, 2013). Ces bactéries possèdent la capacité d'établir des associations symbiotiques avec les nodules racinaires de plus de 200 espèces de plantes ligneuses non légumineuses dans 25 genres d'angiospermes différents, mais peuvent également se retrouver sous forme de saprophyte dans le sol (Benson et Silvester, 1993; Berry *et al.*, 1993; Huss-Danell et Frej, 1986; Normand, 2006; Singh *et al.*, 2010). Lorsqu'en symbiose, *Frankia* rend l'azote davantage disponible pour la plante hôte par sa fixation de l'azote atmosphérique dans le nodule racinaire. (Benson et Silvester, 1993; Chaia *et al.*, 2010; Normand, 2006; Normand *et al.*, 2013). La symbiose qu'établit *Frankia* débute par un processus d'infection du poil racinaire ou par la pénétration de l'épiderme et du cortex racinaire de la plante hôte. Une succession d'événements mènent ensuite à la formation d'une structure appelée nodule racinaire de la plante (Chaia *et al.*, 2010). Une fois l'association symbiotique établie, *Frankia* spp. fixe l'azote atmosphérique dans le nodule racinaire via la formation de structures appelées vésicules. Il est à noter que *Frankia* spp. fixe l'azote atmosphérique autant sous la forme symbiotique que saprophyte. Ceci lui permet de coloniser des environnements pauvres en azote inorganique, un élément limitant pour la croissance de

nombreux microorganismes (Benson et Silvester, 1993). Les souches de *Frankia* infectives sont donc présentes sur plusieurs îles et sur tous les continents, excepté l'Antarctique (Benson et Dawson, 2007). Les souches établies varient spatialement, mais également temporellement (Benson et Dawson, 2007).

1.3 Les morphologies cellulaires retrouvées chez *Frankia* spp.

Quatre morphologies cellulaires sont retrouvées chez *Frankia* spp. Le morphotype le plus abondamment retrouvé en absence de stress environnemental reste l'hyphe végétatif. C'est par la formation de nouveaux embranchements, mais surtout par la croissance apicale des hyphes végétatifs qu'a lieu la croissance active chez *Frankia* spp. (Benson et Schultz, 1990; Normand *et al.*, 2013). D'autres structures sont parfois retrouvées au niveau des hyphes végétatifs chez *Frankia*, il s'agit des vésicules et des sporanges. La vésicule permet la fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries du genre *Frankia* sous leur forme saprophyte et lors d'une symbiose actinorhizienne avec une plante hôte (Benson et Silvester, 1993; Normand *et al.*, 2013). D'autre part, le sporange, par la libération des spores qu'il contient, permet la survie et la dissémination des souches de *Frankia* dans l'environnement (Benson et Silvester, 1993; Normand *et al.*, 2013). Finalement, une quatrième morphologie cellulaire, l'hyphe toruleux, est retrouvée chez *Frankia* spp. Ce dernier morphotype a été observé pour la toute première fois en 1982 par Diem et Dommergues chez *Frankia* sp. Cj1-82 (Diem et Dommergues, 1985; Diem *et al.*, 1982). Le rôle qu'entretient ce dernier morphotype dans le cycle de vie de *Frankia* spp. reste jusqu'à aujourd'hui partiellement inconnu (Bernèche-D'Amours, 2012; Gagnon, 2015; Lafond-Lambert, 2014).

1.3.1 Les hyphes végétatifs

Tel que mentionné précédemment, l'hyphe végétatif est la morphologie cellulaire responsable de la croissance active chez les bactéries du genre *Frankia*. C'est le morphotype abondamment

retrouvé dans les conditions normales de culture (sans stress), utilisées pour la prolifération. Les hyphes végétatifs mesurent de 0.5-2.0 μm de diamètre, mais peuvent s'élargir chez de vieilles cultures (Benson et Silvester, 1993; Normand *et al.*, 2013). Ces hyphes sont septés, de longueur variable, et peuvent être étroitement enchevêtrés (Benson et Silvester, 1993). La croissance des hyphes se produit par une elongation apicale et par la formation de septations branchées (Benson et Silvester, 1993). Par microscopie à épifluorescence, à l'aide d'une coloration au *LIVE/DEAD*®, il est possible de constater que chaque hyphe est constitué de plusieurs cellules séparées entre elles par des septations en continuité avec la membrane plasmique et la paroi cellulaire (Benson et Eveleigh, 1979; Benson et Silvester, 1993) (figure 1A). À l'intérieur des hyphes, il est possible de retrouver des granules de lipides et de glycogène (Benson et Silvester, 1993). Au niveau ultrastructural, la cellule possède également une apparence granuleuse due à la grande quantité de ribosomes présents dans le cytoplasme (figure 1B) (Bernèche-D'Amours, 2012; Fontaine *et al.*, 1984). Des pigments intra- et extracellulaires peuvent occasionnellement se former dans les hyphes ou le milieu environnant, respectivement (Normand *et al.*, 2013).

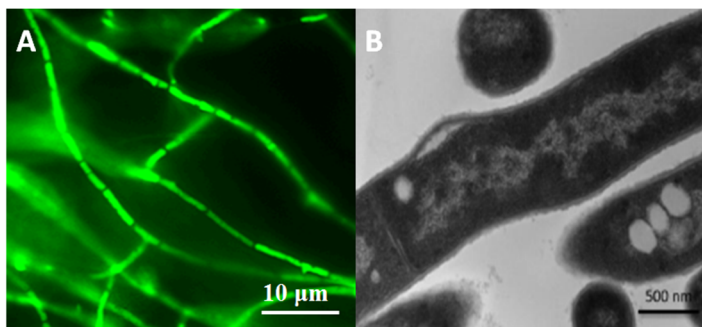


Figure 1 : Les hyphes végétatifs de *Frankia alni* ACN14a observés par microscopie à épifluorescence suite à une coloration au *LIVE/DEAD*®, à grossissement 1000x (A) et par microscopie électronique à transmission (TEM), tiré de Bernèche-D'Amours (2012) (B).

1.3.2 Les vésicules

La fixation de l'azote atmosphérique est catalysée par l'enzyme nitrogénase (Benson et Silvester, 1993; Berry *et al.*, 1993; Normand *et al.*, 2013). Vue la sensibilité à l'oxygène de l'enzyme nitrogénase, le processus de fixation de l'azote atmosphérique chez les organismes aérobies requiert un mécanisme pour limiter la présence d'oxygène près du site d'activité de l'enzyme. L'exclusion de l'oxygène chez *Frankia* spp. est accomplie par l'intermédiaire de structures appelées vésicules. C'est à l'intérieur de ces structures que le processus de fixation de l'azote a lieu (Benson et Silvester, 1993; Berry *et al.*, 1993; Krumholz *et al.*, 2003a; Normand *et al.*, 2013). Une enveloppe lipidique est présente autour de ces cellules fixatrices d'azote, formant ainsi une barrière externe qui protège l'enzyme nitrogénase de l'oxygène ambiant en limitant la diffusion des gaz vers l'intérieur de la vésicule (Berry *et al.*, 1993). La formation des vésicules se produit normalement en réponse à une carence en azote dans le milieu environnant. Ces cellules fixatrices d'azote apparaissent comme des gonflements terminaux sur les hyphes ou sur les branches latérales. Ces dernières possèdent un diamètre allant de 2 à 4 μm (figure 2) (Benson et Silvester, 1993; Normand *et al.*, 2013).

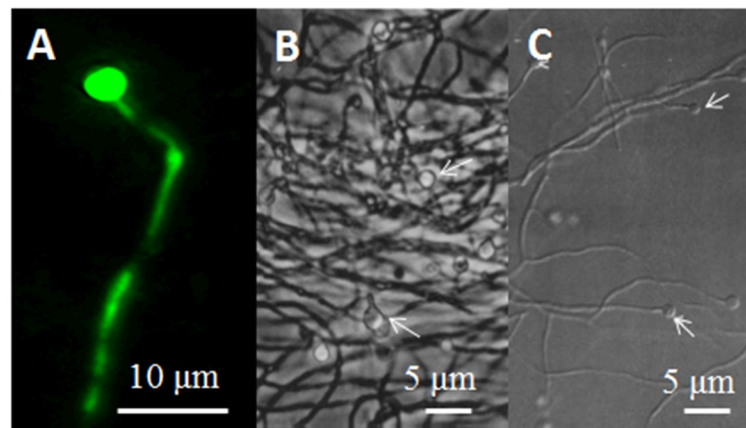


Figure 2 : Les vésicules retrouvées chez *Frankia* spp. (A) Une vésicule chez *Frankia alni* ACN14a, observée par microscopie à épifluorescence suite à une coloration au *LIVE/DEAD*®, à un grossissement de 1000x. (B) Les vésicules chez *Frankia alni* HFPCp11, observées par microscopie à contraste de phase, les flèches blanches pointent les vésicules, figure modifiée

de Benson et Silvester (1993). (C) Les vésicules chez *Frankia* sp. Ccl3 tel qu'observées par microscopie optique Nomarski, les flèches blanches pointent les vésicules, figure modifiée de Benson et Silvester (1993).

1.3.3 Les sporanges

Les sporanges sont les structures responsables de la survie et de la dissémination chez le genre *Frankia* (Benson et Silvester, 1993; Diem et Dommergues, 1985). Ces structures sont retrouvées chez pratiquement toutes les souches de *Frankia* isolées (Benson et Silvester, 1993). Le sporange apparaît comme une structure de longueur supérieure à 100 µm (Normand *et al.*, 2013). Cette dernière est positionnée de façon terminale, latérale ou intercalaire sur l'hyphe (Benson et Silvester, 1993; Newcomb *et al.*, 1979; Normand *et al.*, 2013). Le développement de ce dernier débute par un épaississement de l'hyphe. Par la suite, une segmentation dans les trois axes a lieu à partir de septa présents dans la couche interne du mur cellulaire sporangial à double couche. Un sporange multiloculaire de forme circulaire ou irrégulière contenant des spores est alors créé (figure 3A et B) (Benson et Silvester, 1993; Newcomb *et al.*, 1979; Normand *et al.*, 2013). Il est à noter que le développement et la maturation des sporangiospores ne s'effectuent pas de façon simultanée, résultant en la présence de spores de différents niveaux de maturité dans un même sporange (Normand *et al.*, 2013). Les spores immatures sont de forme irrégulière et les spores matures sont de forme sphérique, ovoïde ou polygonale et mesurent de 1 à 5 µm de diamètre (figure 3C) (Benson et Silvester, 1993). Le nombre de spores contenu dans les sporanges varie de quelques-uns à plusieurs centaines dépendamment de l'âge des cultures et de la composition du milieu (Benson et Silvester, 1993; Normand *et al.*, 2013). Les spores sont généralement incolores, mais parfois noirs. Ils possèdent une membrane externe multicouche et ne sont pas résistants à la chaleur (Normand *et al.*, 2013). La plupart des souches de *Frankia* sporulent lorsqu'en culture. Malgré tout, la majorité des souches présentent un faible taux de germination des spores *in vitro* (environ 1%) (Krumholz *et al.*, 2003a). Le faible potentiel de germination serait corrélé avec une absence du relâchement des spores dans le milieu environnant (Tzean et Torrey, 1989). Une analyse du contenu en ADN des spores de *Frankia* sp. ACN1 a également

démontré que seulement 9 % des spores contiennent de l'ADN (Krumholz *et al.*, 2003a). Les paramètres de croissance tels les nutriments, la température, la disponibilité de surface et le type d'agar affectent aussi le degré de sporulation chez différentes souches de *Frankia* (Benson et Silvester, 1993; Krumholz *et al.*, 2003a).

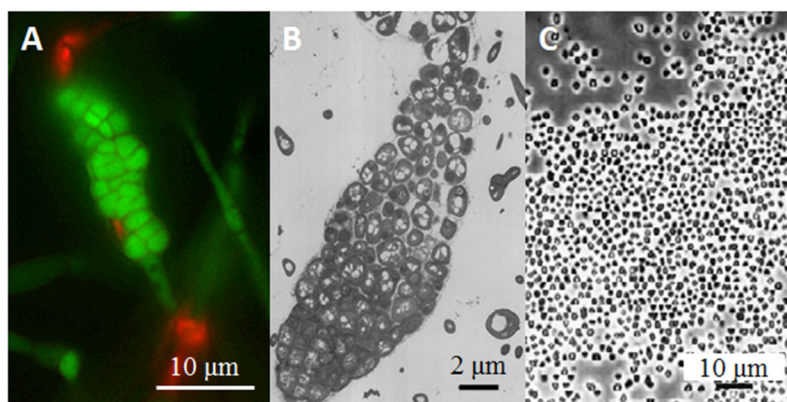


Figure 3 : Sporange de *Frankia* spp. (A) Un sporange multiloculaire chez *Frankia alni* ACN14a, observé par microscopie à épifluorescence suite à une coloration au LIVE/DEAD®, à un grossissement de 1000x. (B) Un sporange multiloculaire chez *Frankia* sp. Ccl3, observé par microscopie électronique à transmission, figure modifiée de Benson et Silvester (1993). (C) Une suspension purifiée de spores provenant de *Frankia* sp. Eul1c, observée en microscopie à contraste de phase, figure modifiée de Krumholz *et al.* (2003).

1.3.4 Les hyphes toruleux

Les premières observations rapportant l'existence de l'hyphe toruleux ont été réalisées en 1982 par Diem et Dommergues. Les auteurs avaient rapporté la présence de cette structure chez *Frankia* sp. Cj1-82, une souche isolée d'un nodule de *Casuarina junghuhniana* (figure 4A). Cette morphologie cellulaire a été décrite à cette époque par les auteurs comme un sporange intercalaire allongé plutôt que terminal (Bernèche-D'Amours, 2012; Diem et Dommergues, 1985). Dans une autre revue de littérature publiée en 1985, les auteurs décrivent plus

explicitement cette structure observée chez *Frankia* sp. Cj1-82 qu'il nomment alors « *Reproductive Torulose Hyphae* » (ou « RTH ») (Diem et Dommergues, 1985). L'hyphe toruleux caractérisé par Diem et Dommergues résulte de l'élargissement et de la formation de septations transversales multiples chez l'hyphe végétatif. Cette caractéristique donne à l'hyphe toruleux l'apparence d'une chaîne de spores (Diem et Dommergues, 1985). Il présente des dimensions allant de 30 à 50 µm de longueur et 1,5 à 3-4 µm de largeur. Il est constitué de cellules ou « propagules » allant de 2 à 3 µm de largeur et 3 à 4 µm de longueur (figure 4) (Diem et Dommergues, 1985). L'hyphe toruleux semble également présenter une paroi typique d'un hyphe végétatif composée de deux couches : une épaisse couche interne peu dense aux électrons et une mince couche externe dense aux électrons (Diem et Dommergues, 1985). Selon Diem et Dommergues (1985), le développement des septations transversales chez l'hyphe toruleux serait associé à la présence de mésosomes. Certaines cellules constituant l'hyphe toruleux contiennent également des corps globuleux de lipides et des granules de polyphosphate. Ces dernières serviraient d'unité d'entreposage chez les chlamydospores de champignons (Diem et Dommergues, 1985). D'autre part, c'est en observant des hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a, que Bernèche D'Amours (2012) confirma la structure de ces derniers. Tout comme chez *Frankia* sp. Cj1-82, l'hyphe toruleux présent chez *Frankia alni* ACN14a consiste en un hyphe élargi abondamment septé, donnant l'apparence d'une chaîne de cellules individuelles et bombées (figure 4B) (Bernèche-D'Amours, 2012). Les RTH sont normalement peu retrouvés dans les conditions non stressantes telles que celles utilisées pour la prolifération active du microorganisme *in vitro*. Malgré tout, il arrive régulièrement de voir quelques hyphes toruleux dans des conditions optimales de culture. Leur présence est d'autant plus augmentée chez les cultures vieillissantes. Par ailleurs, les travaux de Bernèche-D'Amours (2012) ont mené au développement d'un milieu de culture modifié permettant une différenciation massive des cellules vers le morphotype RTH chez *Frankia alni* ACN14a. Ce n'est qu'un peu plus tard que deux autres milieux de culture modifiés furent développés par Lafond-Lambert (2014) et Gagnon (2015). Il est important de noter que ces trois milieux engendrent un taux de mortalité très élevé parallèlement à la différenciation en hyphes toruleux (de l'ordre de 60 à 70 %) (Bernèche-D'Amours, 2012; Gagnon, 2015). Cette mortalité observée en milieux de différenciation est entraînée dans certains cas par un stress osmotique et dans d'autres cas par un stress acide également (Bernèche-D'Amours, 2012; Gagnon, 2015).

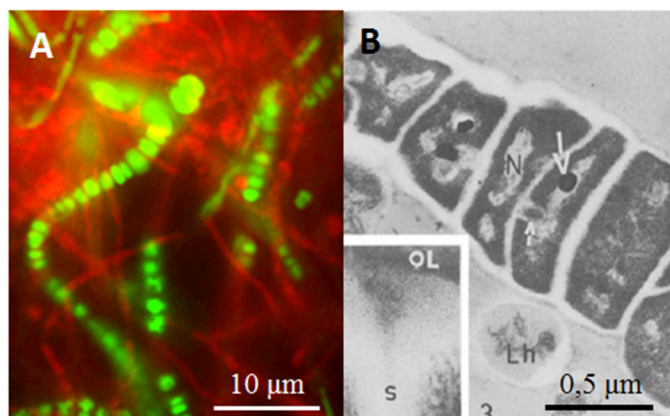


Figure 4 : Les hyphes toruleux retrouvés chez *Frankia* spp. (A) Les hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a, observés par microscopie à épifluorescence suite à une coloration au LIVE/DEAD®, à un grossissement de 1000x. (B) L'hyphe toruleux chez *Frankia* sp. Cj1-82, observé en microscopie électronique à transmission. Lh : hyphe végétatif lysé, OL : couche externe dense, N : matériel nucléaire, S : septum entre les cellules, grande flèche blanche : granule de polyphosphate, petite flèche blanche : septum en formation entre les cellules. Figure modifiée de Diem et Dommergues (1985).

Chez *Frankia* spp., la sporulation semble favorisée par des températures inférieures aux températures de croissances optimales et il en est de même pour le processus de différenciation vers le morphotype RTH (Bernèche-D'Amours, 2012; Burleigh et Torrey, 1990; Krumholz *et al.*, 2003b). Une étude de transcriptomique effectuée par Bernèche-D'Amours (2012) a également démontré la surexpression du gène *sigH* en condition de différenciation. Ce gène coderait pour un régulateur transcriptionnel sigma induit en réponse au stress, nécessaire pour la sporulation chez *Streptomyces* (Sevcikova *et al.*, 2002), et impliqué dans la régulation de la sporulation en pH alcalin chez *Bacillus subtilis* (Wilks *et al.* 2009). Malgré les quelques similitudes présentes chez l'hyphe toruleux et le sporange, des différences majeures les distinguent. Par exemple, chez plusieurs souches de *Frankia*, telles *Frankia* spp. HFPCcl3 et ORS 140102, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments tels que l'azote et le phosphate augmente la production de spores (Bernèche-D'Amours, 2012; Burleigh et Torrey, 1990; Prin *et al.*, 1991). Ce phénomène est tout le contraire de ce qui a pu être observé jusqu'à aujourd'hui concernant l'induction de la différenciation cellulaire vers le

morphotype toruleux. Dans ce dernier cas, il semblerait que ce soit plutôt un excès de nutriments, tels le phosphore, le propionate de sodium et le chlorure de potassium qui induisent la différenciation cellulaire et non un appauvrissement du milieu (Bernèche-D'Amours, 2012; Lafond-lambert, 2014). Par ailleurs, les RTH ne devraient pas être confondus avec les sporanges, puisque ces derniers sont généralement considérés comme des grappes de sporangiospores polyédrales et non comme des chaînes de cellules individuelles connectées les unes aux autres (Diem et Dommergues, 1985). De surcroît, les hyphes toruleux résultent uniquement d'une segmentation transversale de l'hyphe végétatif alors que les sporanges sont principalement produits par segmentation longitudinale et transversale de l'hyphe végétatif (Newcomb *et al.*, 1979). Des différences au niveau de la paroi cellulaire distinguent également les hyphes toruleux des sporanges. La paroi s'avère typique d'un hyphe végétatif chez l'hyphe toruleux, mais davantage complexe chez le sporange (Diem et Dommergues, 1985). De plus, aucune enveloppe externe comparable à la paroi sporangiale n'est observée chez l'hyphe toruleux. Il a également été établi que le RTH nécessite une force mécanique pour permettre la libération des cellules ou « propagules » qu'il contient, alors que le sporange peut libérer les spores qu'il contient de façon autonome sans l'intervention d'une force mécanique lorsqu'à maturité (Diem et Dommergues, 1985). Bernèche-D'Amours (2012) a également démontré par l'entremise de ses travaux que les hyphes toruleux possèdent un métabolisme actif comparativement aux sporangiospores pour lesquels le métabolisme semble plutôt ralenti. Il est à noter que des études effectuées chez les spores de *Frankia* ont également démontré que ces dernières ne semblaient pas très tolérantes à la chaleur (Normand *et al.*, 2013; Sepu *et al.*, 1997). Chez *Frankia alni* ACN14a l'hyphe toruleux semble légèrement plus tolérant à la chaleur que les spores (Bernèche-D'Amours, non publié). De plus, tel que mentionné précédemment, les sporangiospores de *Frankia* spp. germent rarement (Benson et Silvester, 1993; Diem et Dommergues, 1985; Krumholz *et al.*, 2003a) et ceci pourrait probablement s'expliquer par le fait que les spores sont des structures dormantes requérant une activation préalablement à la croissance du tube germinatif (Diem et Dommergues, 1985). Contrairement aux sporangiospores, les RTH reprennent rapidement leur croissance lorsqu'inoculés en milieu frais, donnant naissance à un nouvel hyphe (Diem et Dommergues, 1985). La germination de spores nécessiterait donc une succession d'événements spécifiques alors que la formation d'un nouvel hyphe à partir d'une propagule de RTH ne semblerait pas en nécessiter (Diem et Dommergues, 1985). Les auteurs Diem et Dommergues (1985) ont alors suggéré le terme

« reprise de croissance » pour l'hyphe toruleux plutôt que « germination » telle qu'applicable pour les spores. De plus, selon Cross et Attwell (1975) les spores sont définies par trois caractéristiques principales : elles sont des structures formées chez un organisme végétatif, elles diffèrent de l'organisme végétatif du point de vue morphologique et elles fonctionneraient comme des unités spécialisées pour la reproduction. Les travaux de Diem et Dommergues (1985) et de Bernèche-D'Amours (2012) ont démontré que les RTHs ne devraient pas être considérés comme des spores, car ils diffèrent des spores typiques produits chez le genre *Frankia* du point de vue morphologique, de la morphogénèse, du métabolisme, de la tolérance à la chaleur et de la reprise de croissance. Ces auteurs ont alors inféré un rôle de reproduction à l'hyphe toruleux plutôt qu'un rôle de survie et de dissémination tels que communément inférés aux spores (Bernèche-D'Amours, 2012; Diem et Dommergues, 1985).

1.4 Similitude entre l'hyphe toruleux de *Frankia alni* ACN14a et les morphologies retrouvées chez *Streptomyces* sp. et *Nocardia* sp.

Plusieurs rapprochements peuvent être établis entre l'hyphe toruleux de *Frankia* spp. et l'hyphe sporogène chez *Streptomyces* sp. et *Nocardia* sp. (Bradley, 1959; Gordon et Mihm, 1958). Chez des souches de *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis* et *Nocardia paraguayensis*, tout comme chez *Streptomyces* sp., de courtes chaînes d'arthrospores peuvent se former sur les hyphes aériens (Bradley, 1959; Gordon et Mihm, 1958; Williams *et al.*, 1973). Les étapes impliquées dans la formation de ces hyphes sporogènes semblent similaires à celles impliquées dans la formation d'hyphes toruleux chez *Frankia* spp. (Bradley, 1959; Gregory, 1956), l'apparence de ces derniers est similaire également. Tout comme chez *Nocardia* spp. et *Streptomyces* spp., il est possible de voir chez *Frankia* spp. les hyphes s'élargir significativement préalablement à la formation des hyphes toruleux. À ce moment, il y a présence de seulement quelques septations transversales puis de nombreuses septations transversales sont générées à intervalles réguliers. De plus, les parois latérales résiduelles de l'hyphe aérien sont visibles chez *Frankia alni* ACN14a entre les propagules individuelles tout comme chez *Nocardia* spp. et *Streptomyces* sp. (Bradley, 1959). Chez *Nocardia* spp. et *Streptomyces* sp., une fois les spores à maturité, les chaînes de spores se fragmentent,

relâchant dans le milieu environnant des spores individuelles (Bradley, 1959; Williams *et al.* 1976). Ceci est tout le contraire de ce qui a pu être observé jusqu'à aujourd'hui chez l'hyphe toruleux dans nos conditions de culture.

L'hyphe toruleux caractérisé chez *Frankia* présente également une morphologie similaire aux renflements bulbeux observés chez *Nocardia opucu* en réponse à une carence en zinc et en manganèse (Webley, 1960). De plus, tout comme la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH chez *Frankia*, la différenciation cellulaire chez *N. opucu* se produit lors d'un stress provenant de la composition du milieu de culture et elle semble se produire plus rapidement et plus massivement chez de vieilles cultures lorsqu'en absence de stress (Webley, 1960). Par contre, ce sont des carences en nutriments qui induisent cette différenciation cellulaire plutôt qu'un excès de nutriments tel que nécessaire pour l'obtention d'hyphe toruleux. Une fois les cellules récoltées, lavées et resuspendues dans l'eau distillée, les structures observées observées chez *Nocardia* spp. ne se fragmentent pas, tout comme le RTH caractérisé chez *Frankia alni* ACN14a (Bradley, 1959; Gordon et Mihm, 1958; Webley, 1960). Il est également à noter que les bactéries du genre *Nocardia* sont résistantes au lysozyme (Horowitz *et al.*, 1976) tout comme l'hyphe toruleux de *Frankia alni* ACN14a (Gagnon, non publié). Par ailleurs, chez l'actinomycète *Nocardia corralina*, la différenciation cellulaire est accompagnée d'un métabolisme actif tout comme pour l'hyphe toruleux de *Frankia* spp. (Kalakoutskii et Agre, 1976). Chez *Nocardia* spp. le processus de septation semble également suffisamment bien coordonné pour générer uniquement des cellules viables (Kalakoutskii et Agre, 1976), ceci semble également être le cas pour l'hyphe toruleux dans les conditions de culture employées au laboratoire. Néanmoins, contrairement aux spores produites chez *Nocardia* spp. et *Streptomyces* spp., les cellules individuelles que constituent l'hyphe toruleux ne sont pas relâchées dans nos conditions de culture. Les structures RTH retrouvées chez *Frankia* spp. restent jusqu'à aujourd'hui très peu étudiées. Leur apparition dans plusieurs conditions de cultures développées au laboratoire et de manière reproductible, indique que ces structures sont importantes dans le cycle de vie de *Frankia* spp. (Gagnon, 2015) tout comme l'hyphe sporogène de *Nocardia* sp. et *Streptomyces* sp.

1.5 Le métabolisme secondaire

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques d'un organisme vivant (Campbell et Reece, 2007). Ce dernier comprend le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Le métabolisme primaire, ou trophophase, est caractérisé par un état de prolifération active dans un environnement favorable à la croissance. Le métabolisme secondaire, ou idiophase, est plutôt caractérisé par un ralentissement de croissance, ce dernier correspond habituellement à une fin de phase exponentielle et une phase stationnaire de croissance. C'est durant cette période qu'a lieu la biosynthèse de métabolites secondaires (Davies et Davies, 2010; Demain et Fang, 2000; Malik, 1980; Shapiro, 1989; Walsh, 2003). Ces derniers s'accumulent fréquemment en quantités substantielles *in vitro* et certains sont d'une valeur économique considérable (Malik, 1980). Au contraire des métabolites primaires, les métabolites secondaires sont généralement des composés dispensables et non essentiels au fonctionnement normal d'un organisme vivant (Davies et Davies, 2010; Demain, 2000; Karvlosky, 2007; O'Brien et Wright, 2011; Sánchez et Demain, 2002; Walsh, 2003). Ils sont plutôt des molécules d'adaptation ayant évolué pour des fonctions indépendantes du métabolisme primaire (O'Brien et Wright, 2011). À l'inverse du métabolisme primaire conservé à travers les divers embranchements et royaumes, les métabolites secondaires sont rarement tenus sur une large gamme taxonomique et leur synthèse est plutôt limitée à des genres ou des espèces individuelles pour des raisons physiologiques, sociales, ou de prédation. Ces composés sont donc intimement reliés avec l'écologie des organismes producteurs (Demain et Fang, 2000; Karvlosky, 2007; Malik, 1980; O'Brien et Wright, 2011). Le métabolisme secondaire peut mener à la différenciation cellulaire et à la production de métabolites secondaires (Bibb, 2005; Davies et Davies, 2010; Demain et Fang, 2000a). Il est à noter qu'il arrive parfois que les métabolites primaires et secondaires entretiennent les mêmes fonctions. Une classification de ces métabolites basée sur leurs fonctions respectives reste donc impossible (Karvlosky, 2007). Malgré tout, comme la richesse, la complexité et la variation structurelle des métabolites secondaires excèdent de loin ceux des métabolites primaires, la connaissance directe de la structure moléculaire d'un composé est généralement suffisante pour distinguer les métabolites primaires des métabolites secondaires (Beppu, 1992; Davies, 2007; Karvlosky, 2007; Malik, 1980). Ces derniers sont généralement synthétisés à partir de

précurseurs issus du métabolisme primaire (Malik, 1980; O'Brien et Wright, 2011) et ils comprennent les peptides, les polycétides, les glucides, les lipides, les terpénoïdes, les stéroïdes, et les alcaloïdes (Davies, 2007; Malik, 1980; O'Brien et Wright, 2011). Il est à noter que plusieurs métabolites secondaires possèdent des fonctions antibiotiques, l'antibiotique étant par définition une molécule organique inhibant la croissance ou entraînant la mort d'un microorganisme par des interactions spécifiques avec des cibles bactériennes (Davies et Davies, 2010; Walsh, 2003).

1.6 Utilité du métabolisme secondaire dans l'environnement

L'importance thérapeutique des antibiotiques fait souvent passer sous silence les importantes fonctions qu'effectuent les métabolites secondaires dans l'environnement naturel des microorganismes producteurs (Demain et Fang, 2000; Karvlosky, 2007; Sengupta *et al.*, 2013). L'aspect écologique des antibiotiques est encore aujourd'hui peu compris, l'hétérogénéité des sols rendant leur étude difficile (Demain et Fang, 2000; Karvlosky, 2007; Sengupta *et al.*, 2013). Ces métabolites secondaires sont souvent présents dans la biosphère à des concentrations beaucoup plus faibles que la dose thérapeutique employée en clinique (Bernier et Surette, 2013; O'Brien et Wright, 2011; Sengupta *et al.*, 2013). Aux concentrations normalement présentes dans l'environnement, les antibiotiques présenteraient des effets spécifiques à leur niche écologique naturelle et présenteraient des fonctions autres qu'antibiotiques (Bernier et Surette, 2013; O'Brien et Wright, 2011; Sengupta *et al.*, 2013).

1.6.1 Le rôle des antibiotiques dans la compétition inter-espèces

Plusieurs arguments supportent l'idée que les antibiotiques auraient un rôle à jouer dans la survie de l'organisme producteur lorsqu'en compétition avec d'autres organismes. (Beppu, 1992; Davies, 2007; Demain et Fang, 2000; Karvlosky, 2007; Malik, 1980; O'Brien et Wright, 2011). Ces molécules procureraient dans un premier temps aux microorganismes producteurs

un avantage compétitif en contrecarrant la compétition dans les environnements hautement compétitifs et pauvres en nutriments (Bernier et Surette, 2013; Demain et Fang, 2000; O'Brien et Wright, 2011; Sengupta *et al.*, 2013). La sécrétion d'antibiotique dans le milieu environnant permettrait, par le fait même, à certains microorganismes producteurs de s'établir plus facilement dans une population ou communauté microbienne établie (Wiener, 1996) et protégerait l'organisme producteur lors des événements de sporulation (Demain et Fang, 2000). Dans certains cas, les antibiotiques sécrétés limiteraient également l'établissement de microorganismes compétiteurs dans la rhizosphère des plantes, limitant par le fait même l'établissement de phytopathogènes (Karvlosky, 2007; Sengupta *et al.*, 2013). Par ailleurs, même si les fortes concentrations d'antibiotiques employées en cliniques inhibent la croissance cellulaire, les conditions dans l'environnement dans lesquelles une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber la croissance bactérienne est produite sont difficiles à rencontrer (Bernier et Surette, 2013; O'Brien et Wright, 2011; Sengupta *et al.*, 2013). De plus, il arrive fréquemment que les antibiotiques adhèrent à la surface des cellules productrices plutôt que de diffuser dans le milieu (O'Brien et Wright, 2011).

1.6.2 Rôle des antibiotiques comme molécules de signalisation

Il arrive que les membres d'une communauté microbienne n'entretiennent pas de relation antagoniste, et ce, dans le but de dispenser un avantage évolutif (Davies, 2007; Sengupta *et al.*, 2013). Indépendamment de leur activité antimicrobienne, les antibiotiques auraient un rôle à jouer dans la signalisation intra- et inter- domaines dans les divers écosystèmes. Par ailleurs, à des concentrations 100 fois plus faibles que la concentration minimale inhibitrice, les antibiotiques ne démontreraient aucune activité antimicrobienne, mais démontreraient d'autres activités biologiques et influenceraient grandement les patrons de transcription (Davies, 2006; Sengupta *et al.*, 2013). Ces composés seraient perçus comme des signaux chimiques extracellulaires déclenchant diverses réponses cellulaires (Bernier et Surette, 2013). Par ailleurs, les antibiotiques présentant différents modes d'action altèreraient les patrons de transcription dans différentes circonstances (O'Brien et Wright, 2011; Sengupta *et al.*, 2013). Il a donc récemment été proposé que la machinerie de transcription de la cellule serait en mesure

de détecter les subtiles variations dans la conformation ou la stœchiométrie des molécules antibiotiques pour répondre spécifiquement par une régulation à la hausse ou à la baisse du niveau de transcription des gènes (Sengupta *et al.*, 2013). Par ailleurs, à des concentrations sous-minimales inhibitrices, en plus d'altérer l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et la régulation, certains antibiotiques présentent également la capacité d'altérer l'expression de gènes impliqués dans la virulence, la conjugaison, la réparation de l'ADN, et la réponse au stress (Bernier et Surette, 2013; O'Brien et Wright, 2011; Sengupta *et al.*, 2013).

1.6.3 Antibiotiques et *quorum sensing*

Plusieurs microorganismes s'avèrent capables de réguler l'expression d'un ensemble de gènes spécialisés en réponse à la densité de population. Ce mécanisme régulateur est aussi connu sous le terme d'auto-induction, de *quorum sensing* et de gène de régulation en réponse à la densité de population (Sanchez et Demain, 2002). Le processus de *quorum sensing* repose sur la biosynthèse de molécules signal diffusibles, nommées autoinducteurs (Melissa et Bonnie, 2001; Sanchez et Demain, 2002). Chez la plupart des systèmes bactériens à Gram négatif, les autoinducteurs sont des dérivés N-acétylés nommés L-homosérine lactone (AHLs) alors que les systèmes microbiens à Gram positif comprennent majoritairement les butanolides γ -butyrolactones des actinobactéries et les oligopeptides (Bassler et Miller, 2006; Melissa et Bonnie, 2001; Sanchez et Demain, 2002; Takano, 2006). Le *quorum sensing* est impliqué dans la régulation de phénotypes tels que la sécrétion synchronisée de facteurs de virulence, la bioluminescence, la formation de biofilm, le changement de motilité, la symbiose, la compétence, la conjugaison, la sporulation et la biosynthèse d'antibiotiques (Bibb, 2005; Horinouchi et Beppu, 2007; Miller et Bassler, 2001; Pereira *et al.*, 2013). Lors de tels processus, les cellules doivent inévitablement coordonner l'expression génique pour synchroniser le comportement de la communauté entière afin de s'adapter efficacement à leur environnement, d'où l'importance du *quorum sensing* (Bassler et Miller, 2006; Melissa et Bonnie, 2001; Pereira *et al.*, 2013; Sánchez et Demain, 2002). Il existe dans certains cas une similarité structurale entre les antibiotiques et les molécules de signalisation intracellulaire impliquées dans le *quorum sensing* (Sengupta *et al.*, 2013). Les antibiotiques quinolones produits par

Pseudomonas aeruginosa présentent un large éventail d'activités. En effet, le *pseudomonas quinolone signal* (PQS) a tout d'abord été décrit pour ses activités antibiotiques (Dubern et Diggle, 2008; Heeb *et al.*, 2011). Ce n'est qu'un peu plus tard qu'il a été établi que le PQS occupait un rôle d'autoinducteur au niveau du *quorum sensing* chez ce microorganisme (Dubern et Diggle, 2008; Heeb *et al.*, 2011). D'autres autoinducteurs tel que le *N*-(3-oxododécanoyle) homosérine lactone et son produit de dégradation tétramérique produits par *P. aeruginosa* présentent des propriétés antimicrobiennes envers des bactéries à Gram positif (Kaufmann *et al.*, 2005). En plus du *N*-(3-oxododécanoyle) homosérine lactone, d'autres homosérines lactones possédant des chaînes de 8, 10 ou 14 carbones ont également démontré un potentiel antimicrobien (Qazi *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2013). Finalement, la nisine, un lantibiotique, s'avère être une molécule de signalisation du *quorum sensing* chez certaines bactéries à Gram positif et présente également un potentiel antimicrobien (Williams *et al.*, 2007).

1.7 Les différentes classes de métabolites secondaires

Tel que mentionné précédemment, les métabolites secondaires, incluant les antibiotiques, sont naturellement synthétisés dans l'environnement et assurent la survie des organismes producteurs. Malgré tout, ces métabolites présentent différentes fonctions en lien direct ou indirect avec leur activité antimicrobienne. Certains assurent des fonctions compétitives envers les bactéries, les champignons, les amibes, les plantes, les insectes et les animaux supérieurs, tel est le cas des antibiotiques et des toxines (Bignell *et al.*, 2014; Davies, 2007; Demain et Fang, 2000; Guan *et al.*, 2012; Karvlosky, 2007; Malik, 1980; O'Brien et Wright, 2011). D'autres démontrent plutôt des fonctions de transport de métaux (tel est le cas des sidérophores), d'effecteurs symbiotiques, d'hormones sexuelles ou d'effecteurs de différenciation (Beppu, 1992; Demain et Fang, 2000; Glick, 1995; Rondon *et al.*, 2004). Même si les antibiotiques ne sont pas obligatoires pour la sporulation, certains métabolites, incluant les antibiotiques, stimulent la formation des spores et inhibent ou stimulent leur germination (Andres *et al.*, 1990; Charlang *et al.*, 1982; Demain et Fang, 2000; Grund et Ensign, 1985; Harman *et al.*, 1980; Modest *et al.*, 1984; Taya *et al.*, 1980). Les différentes classes de métabolites secondaires

sont: les antibiotiques, les agents transporteurs de métaux, les effecteurs de différenciation, les métabolites impliqués dans la sporulation, les stimulateurs/inhibiteurs de germination, les effecteurs symbiotiques, les hormones sexuelles et les toxines (Demain et Fang, 2000). Certains métabolites secondaires n'appartiennent à aucune des classes décrites ci-dessus. Ils peuvent être impliqués dans la résistance des spores à la chaleur, aux pressions osmotiques élevées et aux radiations ultraviolettes (Shapiro, 1989). Certains métabolites secondaires peuvent être impliqués dans la régulation du métabolisme secondaire et dans le contrôle des propriétés adhésives des cellules (Shapiro, 1989), alors que d'autres peuvent servir d'agent assurant la pollinisation (Demain et Fang, 2000). Certains métabolites secondaires peuvent aider à la dispersion des microorganismes dans l'air, telle la prodigiosine synthétisée chez *Serratia marcescens* (Demain et Fang, 2000). L'astaxanthine, un pigment de nature caroténoïde retrouvé chez les levures basidiomycètes protégerait également le microorganisme de l'oxygène sous sa forme singulet (Demain et Fang, 2000). Il est à noter qu'un même métabolite secondaire peut jouer plusieurs rôles simultanément.

1.8 La course aux antibiotiques

Mis à part les avantages qu'ils procurent aux microorganismes producteurs dans l'environnement, les antibiotiques s'avèrent largement utiles en clinique, permettant de traiter diverses infections et pathologies (Boucher *et al.*, 2009; Davies et Davies, 2010; Fischbach et Walsh, 2009; Karlovsky, 2007; Vaishnav et Demain, 2011; Witte *et al.*, 2007). Malheureusement, l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques limite généralement leur utilisation clinique à long terme (Davies et Davies, 2010; Fischbach et Walsh, 2009; Sengupta *et al.*, 2013). Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) est estimé comme causant environ 19 000 morts par années aux États-Unis, les frais médicaux associés s'élevant de 3 à 4 milliards de dollars par an (Boucher *et al.*, 2009; Fischbach et Walsh, 2009; Witte *et al.*, 2007). Les pathogènes à Gram négatif « pan-résistants » (PDR) et multirésistants (MDR) aux antibiotiques s'avèrent également menaçants pour la santé publique. Ces souches de *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* et d'*Enterobacter* spp. sont résistants à certains (MDR) ou tous (PDR) les antibiotiques communément utilisés

pour traiter les infections par ces bactéries à Gram négatif : pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, monobactames, quinolones, tétracyclines et aminosides (Boucher *et al.*, 2009; Davies et Davies, 2010; Fischbach et Walsh, 2009; Lewis, 2013). Le résistome environnemental contribue grandement à l'émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques et le taux de morbidité et les coûts résultants s'avèrent astronomiques (Davies et Davies, 2010; Fischbach et Walsh, 2009). Depuis le début des années 1960, seulement quatre classes d'antibiotiques ont été introduites et aucune d'entre elles n'ont eu d'impact majeur jusqu'à présent. Le marché global des antibiotiques, qui s'élève à environ 30 milliards de dollars, reste encore aujourd'hui dominé par les antibiotiques découverts plus d'un demi-siècle auparavant (Fischbach et Walsh, 2009; Lewis, 2013). Selon l'IDSA (Infectious Diseases Society of America), la découverte de nouveaux antibiotiques s'avère une priorité (Boucher *et al.*, 2009; Fischbach et Walsh, 2009). Il est à noter que différentes classes d'antibiotiques existent basées sur leur mécanisme d'action (figure 5). Les quatre principaux mécanismes d'action sont l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, l'inhibition de la synthèse du folate, l'inhibition de la synthèse des protéines et l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques.

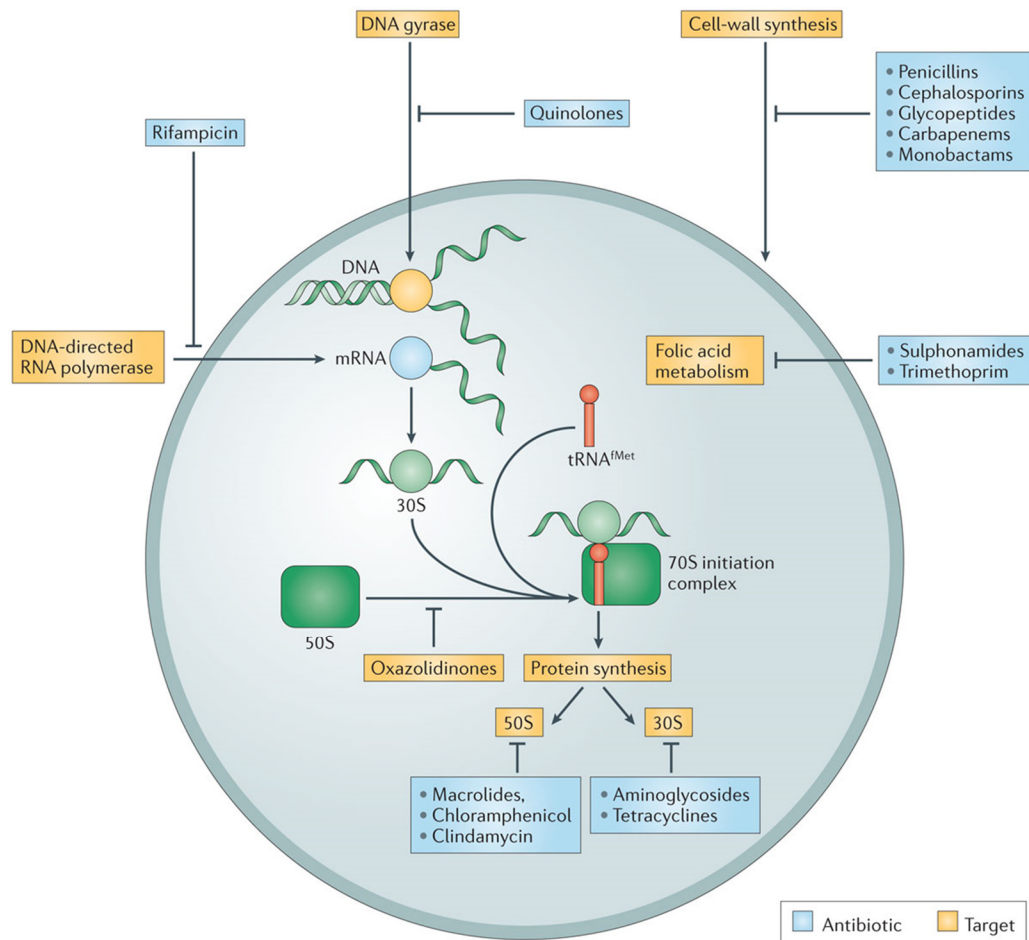


Figure 5 : Les principales cibles antibiotiques. Les antibiotiques les plus efficaces inhibent principalement ces quatre cibles ou voies métaboliques : le ribosome (correspondant aux sous-unités 50S et 30S), la synthèse de la paroi cellulaire, la synthèse de l'ARN et de l'ADN via l'ADN gyrase et l'ARN polymérase dépendante de l'ADN, ainsi que la voie de biosynthèse de l'acide folique. Figure tirée de Lewis (2013).

1.9 Le lien entre la différenciation cellulaire et la production de métabolites secondaires

Tel que mentionné précédemment, les actinomycètes sont de grands producteurs de métabolites secondaires. Il est également connu que chez ces microorganismes, la

biosynthèse de ces composés est fréquemment synchronisée avec les processus de sporulation. Les *Streptomyces* sp., particulièrement *Streptomyces griseus*, sont parmi les exemples les mieux connus (Viollier *et al.*, 2001). L'antibiotique streptomycine, le pigment grinoxone, et le pigment hexahydroxypérylenequinone sont tous des exemples de métabolites secondaires dont la synthèse précède la sporulation chez *S. griseus* (Horinouchi et Beppu, 2007; Scherr et Nguyen, 2009). *Streptomyces coelicolor* (Hengst *et al.*, 2010; Hopwood, 1988; Takano, 2006) et *Streptomyces lividans* (Guyet *et al.*, 2014) sont d'autres exemples d'actinobactéries pour lesquels les événements de différenciation cellulaire et de production de métabolites secondaires sont intimement associés. Il a été démontré dans la littérature, tout comme pour *S. griseus*, que des mutants *S. coelicolor* incapables de former le mycélium aérien (mutants bald ou bld) s'avèrent incapables de synthétiser les pigments antibiotiques actinorhodine et undecylprodigiosine (Chater, 1998; Kelemen et Buttner, 1998; Viollier *et al.*, 2001). Malgré la fréquence d'un lien existant entre les événements de différenciation cellulaire et de biosynthèse de métabolites secondaires, il arrive que ces deux processus soient distincts (Bibb, 2005). La biosynthèse de l'antibiotique virginiamycine chez *Streptomyces virginiae* (Bibb, 2005), des antibiotiques showdomycine et minimycine chez *Streptomyces lavendulae* (Bibb, 2005; Kitani *et al.*, 2001) et des pigments antibiotiques Act et Red chez *S. coelicolor* (Bibb, 2005; Takano *et al.*, 2001) sont tous des exemples pour lesquels la biosynthèse de métabolites secondaires n'est pas intimement associée à la différenciation cellulaire.

La corrélation chez plusieurs actinobactéries entre les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotique, ainsi que la nécessité de découvrir de nouveaux antibiotiques pour combattre les pathogènes multirésistants émergents, accentue l'urgent besoin de trouver de nouvelles sources d'antibiotiques. Nous avons ici l'opportunité d'étudier les structures RTH retrouvées chez *Frankia* qui pourraient être associées à la production de métabolites secondaires et de nouveaux antibiotiques.

1.10 Les antibiotiques potentiellement produits chez *Frankia* sp.

Jusqu'à ce jour, peu d'études ont été réalisées chez *Frankia* sp. concernant son potentiel de production d'antibiotiques. Des études réalisées sur des extraits de surnageant de cultures de *Frankia* sp. ont démontré la présence de ce type de composés. En effet, deux pigments antibiotiques benzo[a]naphtacène quinones nommés G-2N et G-2A furent isolés puis caractérisés chez *Frankia* sp. G2, une souche isolée de *Casuarina equisetifolia* (Gerber et Lechevalier, 1984). Ces derniers seraient également produits chez 6 autres souches : D11 (ORS020602), DBB-Eu11b, ULQ-EuN1f, ULQ-EAN1_{pec}, DBB-53001 et ULF-Hipp (Gerber et Lechevalier, 1984). Les pigments G-2N et G-2A ont également été isolés chez *Frankia* sp. ANP 190107, une souche isolée de *Shepherdia argentea* (Medentsev *et al.*, 1989). Selon Medentsev *et al.* (1989), le pigment G-2N inhiberait l'activité de la chaîne respiratoire chez la bactérie à Gram positif du sol *Arthrobacter globiformis* et la levure *Candida albicans* dans la portion coenzyme Q-cytochrome b. Une inhibition de la croissance du phytopathogène *Fusarium decemcellulare* a également été observée en présence du composé (Medentsev *et al.*, 1989). Le pigment G-2N correspond au produit de décarboxylation de l'acide G-2A (Gerber et Lechevalier, 1984). Ce dernier étant inactif, ce phénomène serait probablement dû à la présence du groupement carboxyle qui augmenterait les propriétés hydrophiles du composé, réduisant ainsi son habileté à pénétrer la membrane plasmique des cellules pour aller interférer avec la chaîne de transport des électrons (Medentsev *et al.*, 1989).

Le troisième antibiotique isolé chez *Frankia* est la cézomycine C-11 déméthyle ou frankiamide (Haansuu *et al.*, 2001). Cet antibiotique appartiendrait à la classe des calcimycines, cette dernière comprenant un petit groupe d'antibiotiques naturels capable de transporter des cations métalliques mono et divalents à travers les membranes biologiques (Sarma *et al.*, 2003). Au contraire des composés benzo[a]naphtacènes quinones qui sont pigmentés, la frankiamide est plutôt incolore (Haansuu *et al.*, 2001). L'antibiotique en question a été isolé chez *Frankia* sp. AiPs1, une souche isolée de *Pinus sylvestris*, et démontrerait une activité antimicrobienne contre 14 souches bactériennes à Gram positif et 6 souches fongiques pathogènes. Parmi les souches à Gram positif on retrouve entre autres *B. subtilis*, *Brevibacillus*

laterosporus (un pathogène d'invertébrés du sol) (Casida et Liu, 1974), *S. aureus* de type sauvage et résistant à la méthicilline (MRSA), *Streptococcus pyogenes* dont plusieurs souches sont résistantes à l'érythromycine, l'actinomycète phytopathogène *Clavibacter michiganensis* et le pathogène *Enterococcus faecalis*, un microorganisme pouvant causer des infections mortelles chez l'homme (Haansuu *et al.*, 2001; Hollenbeck et Rice, 2012). La frankiamide s'est également avérée active envers les champignons phytopathogènes *Phytophthora* sp. (un phytopathogène pouvant s'attaquer à l'aulne), *Botrytis cinerea* et *Fusarium culmorum*. Il est à noter que l'actinomycète phytopathogène *Clavibacter michiganensis* et l'oomycète *Phytophthora* sp. étaient particulièrement sensibles à la frankiamide. L'antibiotique inhiberait aussi fortement les flux de Ca^{2+} dans les cellules tumorales clonales CH4C1 d'hypophyse de rat et serait comparable à un antagoniste de calcium fréquemment utilisé pour traiter les troubles cardiovasculaires; l'hydrochlorure de verapamil (Haansuu *et al.*, 2001). Un dernier antibiotique, la frankiamicine A, a récemment été isolé chez *Frankia* sp. EAN1pec. Cet antibiotique serait un composé polycétide, tout comme les pigments benzo[a]naphtacènes quinones G-2N et G-2A. La molécule aurait démontré une faible toxicité envers *S. aureus* de type sauvage et MRSA, mais aucune toxicité envers les cellules cancéreuses et envers les autres microorganismes testés.

Mis à part les quelques molécules antibiotiques isolées et caractérisées chez *Frankia* sp., deux études de bio-informatique ont également démontré la possibilité d'une étendue plus vaste de métabolites secondaires produits chez cet organisme (Marsh *et al.*, 2010; Udvary *et al.*, 2011). Plus de 65 îlots de gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires ont été identifiés chez *Frankia alni* ACN14a, *Frankia* sp. Ccl3 et *Frankia* sp. EAN1pec (Udvary *et al.*, 2011). Ces derniers pourraient être impliqués dans la biosynthèse de sidérophores, de peptides cycliques, de pigments, de lipides spécialisés, de terpènes, de bactériocines et d'antibiotiques. Parmi les îlots de gènes associés à la biosynthèse d'antibiotiques on retrouvait entre autres des îlots associés à la biosynthèse de composés aminocyclitol, soit la composante majeure des antibiotiques appartenant à la classe des aminosides (Udvary *et al.*, 2011). Des îlots de gènes associés à la biosynthèse d'un nouvel antibiotique spirotétrone, d'un composé ayant certaines caractéristiques des antibiotiques polycétide ansamycine tel que la rifamicine, et d'un composé tridécapéptide halogéné

semblable aux antibiotiques du groupe des vancomycines ont également été identifiés. Un thiopeptide hautement modifié connexe à l'antibiotique thiocilline produit par *B. subtilis* serait aussi putativement produit chez *Frankia* sp. Ccl3. Un composé herbicide phosphinothricin tripeptide et un composé antitumoral seraient aussi potentiellement produits chez *Frankia alni* ACN14a (Udwary *et al.*, 2011). Plusieurs gènes et/ou îlots de gènes associés à la biosynthèse de lantibiotiques de type I auraient aussi été identifiés chez *Frankia alni* ACN14a, *Frankia* sp. Ccl3, *Frankia* sp. EAN1pec et *Frankia* sp. Eul1c. Un seul îlot et trois îlots complets ont été identifiés chez *Frankia* sp. Eul1c et *Frankia* sp. Ccl3, respectivement. Trois gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de lantibiotiques de type I ont également été identifiés chez *Frankia* sp. EAN1pec et un îlot de biosynthèse putatif a également été identifié chez *Frankia alni* ACN14a (Marsh *et al.*, 2010). Il est à noter que les îlots de gènes de biosynthèse de lantibiotiques isolés chez *Frankia* sp. ressemblaient grandement à ceux identifiés chez *Streptomyces* sp. (Marsh *et al.*, 2010).

1.11 Gènes surexprimés lors de la différenciation cellulaire vers le morphotype toruleux chez *Frankia alni* ACN14a

L'analyse transcriptomique réalisée par Audrey Bernèche-D'Amours (2012) chez des cultures de *Frankia alni* ACN14a différenciées ou non en hyphes toruleux a révélé la surexpression de 77 gènes d'intérêts chez *Frankia alni* ACN14a sous la forme RTH. Les 10 gènes les plus surexprimés ont été étudiés de façon plus spécifique par Lafond-Lambert (2014), il s'agit des gènes *kdpC*, FRAAL2084, *atpD*, FRAAL3700, *thiC*, *ileS*, FRAAL2827, *sigH*, *capD* et FRAAL2028. Plusieurs de ces gènes pourraient potentiellement être impliqués dans la biosynthèse d'antibiotiques. Les gènes en question sont *ileS*, FRAAL2827, *sigH*, *capD* et FRAAL2028.

Le gène *ileS* coderait pour une enzyme isoleucyl-ARNt synthétase et permettrait le bon appariement de l'isoleucine lors de la synthèse protéique (Lee *et al.*, 2004; Paulander *et al.*, 2010). Comme plusieurs peptides antibiotiques tels que les actinomycines produites par

Streptomyces antibioticus et *Streptomyces chrysomallus* et le lipopeptide antibiotique A54145 produit par *Streptomyces fradiae* sont constitués en partie d'isoleucine, *ileS* pourrait être impliqué dans la production d'antibiotiques en plus de la réponse au stress en milieu de différenciation RTH (Boeck et Wetzel, 1989; Yajima *et al.*, 1972).

Le gène FRAAL2827 coderait pour une protéine de transfert de lipide composée d'un domaine thiolase (Lafond-lambert, 2014). Ce type de protéine serait impliqué dans la biosynthèse de composés stéroïdes, d'acides gras, de polycétides et de précurseurs de composés terpénoïdes (mévalonate) (Meriläinen *et al.*, 2009; Okamura *et al.*, 2010). Plusieurs métabolites secondaires composés d'acides gras ont déjà été caractérisés chez *Frankia* sp., de même que plusieurs ilots de gènes associés à la biosynthèse de métabolites secondaires de type terpénoïdes et d'antibiotiques d'origine polycétide (Udwary *et al.*, 2011). Plusieurs antibiotiques d'origine polycétides ont également été caractérisés chez *Frankia* sp., incluant notamment deux pigments benzo[a]naphtacènequinone (Gerber et Lechevalier, 1984; Medentsev *et al.*, 1989; Rickards, 1989) et la frankiamicine A (Ogasawara *et al.*, 2015). FRAAL2827 pourrait donc intervenir dans la résistance au stress lors de la différenciation cellulaire en hyphes toruleux en permettant un épaissement de la membrane plasmique, mais pourrait également intervenir dans la biosynthèse de métabolites secondaires dont les antibiotiques au moment de la différenciation (Lafond-lambert, 2014; Udwary *et al.*, 2011).

Le gène *sigH* coderait pour un facteur sigma alternatif. C'est à l'aide de ces facteurs que les bactéries médient habituellement les réponses aux stress (Sevciková *et al.*, 2001). Ces facteurs sigma alternatifs se lieraient au site catalytique de l'ARN polymérase pour permettre l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress (Sevcikova *et al.*, 2010). Le facteur SigH est impliqué dans la régulation de la réponse au choc osmotique et dans la différenciation morphologique chez *S. coelicolor* A(3) (Sevcikova *et al.*, 2010; Sevciková *et al.*, 2001). Il jouerait également un rôle essentiel dans l'initiation de la différenciation cellulaire et de la biosynthèse d'antibiotique chez *S. griseus* sur milieu glucosé. L'inactivation de *sigH* entrainerait une perte de formation du mycélium aérien, mais aussi une déficience dans la biosynthèse de streptomycine en présence d'une concentration élevée de glucose (>2%) (Takano *et al.*, 2003).

D'ailleurs, le facteur sigma H serait impliqué dans la biosynthèse de plusieurs antibiotiques dont la gramicidine S chez *Bacillus* sp. (Brian *et al.*, 2012). *sigH* pourrait donc être impliqué dans la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques chez *Frankia* sp. en condition de stress osmotique.

Le gène *capD* coderait pour une enzyme transmembranaire dTDP-glucose-4,6-déshydratase catalysant la conversion du dTDP-glucose en dTDP-4-céto-6-déoxyglucose (Hegeman *et al.*, 2001). De nombreux composés 6-déoxycarbohydates sont utilisés pour la biosynthèse de lipopolysaccharides bactériens et de divers autres métabolites secondaires tels les antibiotiques (Hegeman *et al.*, 2001). De ce fait, l'enzyme dTDP-glucose-4,6-déhydratase occupe un rôle majeur dans la biosynthèse d'antibiotiques, elle serait impliquée dans la voie de biosynthèse des aminosides chez *Streptomyces tenebrarius* H6 et dans la biosynthèse des streptomycines, des spectinomycines et des kasugamycines (Du *et al.*, 2004). En plus de son implication possible dans la biogenèse de l'enveloppe cellulaire au moment de la différenciation cellulaire en hyphes toruleux (Bernèche-D'Amours, 2012), ce gène pourrait être associé à la biosynthèse d'antibiotiques en conditions de différenciation RTH.

Le gène FRAAL2028 coderait pour une enzyme glycane synthétase possédant des motifs glycosyltransférase (Lafond-lambert, 2014). Plusieurs antibiotiques subiraient une réaction de glycosylation durant leur biosynthèse par le microorganisme producteur. La glycosylation surviendrait chez les antibiotiques polycétides appartenant aux classes des macrolides et des tétracyclines tels que l'érythromycine, la carbomycine et la daunomycine, ainsi que chez les antibiotiques peptidiques non ribosomiaux appartenant à la classe des vancomycines et chez l'antibiotique novobiocine appartenant au groupe des aminocoumarines (Walsh, 2003). Le gène FRAAL2028 pourrait donc être impliqué dans la biosynthèse d'antibiotiques en condition de différenciation RTH étudiée par Bernèche-D'Amours (2012) et Lafond-Lambert (2014).

1.12 Hypothèses et objectifs du mémoire

À ce jour, les hyphes toruleux retrouvés chez *Frankia* restent largement sous-étudiés. Il y a plus d'une trentaine d'années, une étude décrivait largement leur structure et leur proposa des fonctions potentielles (Diem et Dommergues, 1985). Vingt-sept ans plus tard, un milieu permettant d'induire une différenciation cellulaire massive vers le morphotype RTH a été développé par notre équipe. Le milieu en question présente une concentration de 50 mM de KH_2PO_4 et un pH de 5,85 et induisait la différenciation en hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a de manière reproductible (Bernèche-D'Amours, 2012). Suite à des épisodes sporadiques de non-différenciation des hyphes de *Frankia alni* ACN14a dans ce milieu, il a été découvert que l'état physiologique d'un inoculum influençait la capacité subséquente des hyphes à se différencier vers le morphotype RTH une fois plongés en milieu inducteur (Gagnon, 2015). Il a été démontré que la différenciation en hyphes toruleux chez *Frankia alni* ACN14a se produisait seulement dans certaines phases de croissance en erlenmeyer et en bioréacteur (Gagnon, 2015).

Le présent projet est donc consacré à l'étude de l'effet qu'ont divers paramètres de culture de *Frankia* spp. sur son métabolisme secondaire et sa capacité à se différencier vers le morphotype RTH. Ces travaux visaient aussi optimiser la production d'hyphes toruleux à l'échelle d'erlenmeyers et de bioréacteur et évaluer le lien entre la différenciation cellulaire et la production de métabolites antibiotiques.

Le premier objectif du projet se subdivise en deux sous-objectifs. Le premier sous-objectif (1.1) visait à optimiser la méthode d'induction de la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH à l'échelle d'erlenmeyer chez *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a. L'hypothèse supportant l'objectif 1.1 est le suivant : l'état physiologique des cultures peut influencer la capacité des hyphes à se différencier et à produire des métabolites secondaires. Le second sous-objectif (1.2) était d'évaluer le lien entre la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques basé sur les expériences effectuées en 1.1. Pour l'objectif 1.2 notre hypothèse

était la suivante : chez les actinomycètes, la production de métabolites secondaires est intimement associée à la différenciation cellulaire, donc les cultures de *Frankia* différenciées produiront des antibiotiques. L'effet du nombre de passages d'une préculture et sa concentration protéique, ainsi que le degré d'homogénéisation à la seringue et l'âge d'un inoculum au moment de démarrer l'expérience ont été étudiés. Le potentiel antimicrobien d'extraits de surnageant provenant de ces expériences a aussi été évalué envers diverses souches d'intérêt clinique pour évaluer le lien entre la différenciation cellulaire et la production de métabolites secondaires chez *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a. Il est évident que l'obtention d'hyphes toruleux et d'antibiotiques en plus grande quantité faciliterait davantage l'étude du métabolisme secondaire chez cette morphologie cellulaire. Malgré les diverses tentatives achevées par Gagnon (2015), l'obtention massive de RTH à l'échelle de bioréacteur de 2,2 l ne s'est pas produite.

Le deuxième objectif du projet visait à optimiser le métabolisme secondaire chez *Frankia alni* ACN14a à l'échelle de bioréacteur. Depuis l'étude de Gagnon (2015), plusieurs expériences au laboratoire (dont certaines qui seront décrites lors du présent ouvrage) ont démontré une importance du CO₂ pour la croissance, et donc le métabolisme primaire chez *Frankia alni* ACN14a. Une limitation de la présence du CO₂ en bioréacteur a notamment permis d'optimiser la recette d'induction de la différenciation cellulaire et la production d'antibiotique chez *Frankia alni* ACN14a à l'échelle de bioréacteur de 2,2 l.

CHAPITRE 2

ÉTUDE DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE ET DU MÉTABOLISME SECONDAIRE CHEZ *FRANKIA* SPP.

2.1 Mise en contexte

Afin de permettre une étude plus exhaustive de l'hyphe toruleux identifié chez *Frankia alni* ACN14a, un milieu de culture permettant une différenciation cellulaire massive et reproductible vers le morphotype RTH chez cette souche a été développé par Bernèche-D'Amours (2012). Ce milieu BAPS modifié présentait une concentration de 50 mM de KH_2PO_4 et un de pH 5,85. Depuis, il est arrivé qu'à plusieurs reprises, au laboratoire, ce milieu inducteur ne permette plus la différenciation massive vers l'hyphe toruleux chez *Frankia alni* ACN14a (Gagnon, 2015). Il a alors été découvert que l'état physiologique d'un inoculum influençait la capacité subséquente des cellules à se différencier vers le morphotype RTH une fois ces dernières plongées en milieu inducteur, la différenciation se produisant seulement dans certaines phases de croissance (Gagnon, 2015). Dans le présent chapitre, plusieurs paramètres impliqués dans la préparation de l'inoculum au laboratoire ont été criblés afin d'évaluer leur effet sur la différenciation en hyphes toruleux et la production d'antibiotiques chez *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a. Les paramètres étudiés étaient : le nombre de passages d'une préculture et la concentration protéique à laquelle la préculture est inoculée, ainsi que le degré d'homogénéisation à la seringue et l'âge de l'inoculum au moment de démarrer une expérience de différenciation. L'étude de ces paramètres a été effectuée dans le but de rendre reproductible la méthode de différenciation à l'échelle d'erlenmeyer chez *Frankia* sp. Un suivi des cultures a été effectué via des observations en microscopie à épifluorescence afin d'évaluer le degré de différenciation des hyphes en réponse aux différents traitements. D'autre part, des extraits de surnageant ont également été prélevés dans le temps pour en évaluer le potentiel antimicrobien. À la vue de tous ces résultats, un lien entre la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques pourra être évalué chez *Frankia* sp.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes employées pour les expériences présentées dans ce chapitre, soit *Frankia alni* ACN14a (ULQ0102014010), ci-après ACN14a, et *Frankia* sp. ACN10a (ULQ010201001), ci-après ACN10a, proviennent de la collection du Pr. Maurice Lalonde et ont été gracieusement fournies par le Centre d'étude de la forêt de l'Université Laval (Lalonde, 1982).

2.2.2 Maintien des cultures et préparation des inocula

Les souches ACN14a et ACN10a ont été cultivées à 30 °C dans 400 ml de milieu BAPS en erlenmeyers de 1 l (Bélanger *et al.*, 2011), en conditions statiques, à l'obscurité. À moins de spécifications dans les sections 2.2.7 à 2.2.10, les manipulations suivantes ont été réalisées telles que décrites par Bélanger *et al.* (2011). Brièvement, des cultures âgées de deux semaines ont été utilisées comme inoculum, les cellules ont été lavées avec de la saline 0.85 % et homogénéisées avec 10 coups de piston à la seringue, puis la concentration protéique de l'inoculum homogénéisé a été déterminée. À moins d'indication contraire, lors des repiquages permettant le maintien des cultures, ces dernières ont été passées à une concentration protéique approximative. La respiration cellulaire des cultures ayant servi d'inoculum a été déterminée la veille de l'expérience par une coloration au *MTS/PMS* tel que décrit par Bélanger *et al.* (2011). En bref, 75 µl de réactif *MTS/PMS* ont été ajoutés à 1 ml de culture puis incubés pour une période de 4 h à 30 °C, à l'obscurité. Une observation de la viabilité et de l'absence de contamination des cultures a également été réalisée la veille de l'expérience et tout au long des expériences par microscopie à épifluorescence à l'aide du colorant *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial viability kit* (Life Technologies, Carlsbad, CA). Brièvement, 20 µl d'un ratio 1 : 1 (culture : colorant) ont été superposés entre une lame (*Superfrost® Plus*, Fisher scientific

company, Ottawa, ON) et une lamelle 22x30 (*Fisherfinest™ Premium cover glass, Fisher scientific company, Ottawa, ON*). Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope à épifluorescence inversé (*Olympus 1X70, Olympus Canada inc., Richmond Hill, ON, Canada*). Les photos ont été prises avec la caméra monochrome CoolSNAP-Pro et traitées avec le programme Image Pro Plus version 5.1 (*Media Cybernetics, San Diego, CA*). Un minimum de 10 à 15 champs ont été observés pour l'établissement de chacune des valeurs de pourcentages de viabilité et de RTH.

2.2.3 Inoculation des milieux inducteurs et non inducteurs

Les souches ACN14a et ACN10a ont été inoculées dans 400 ml de milieu BAPS (Bélanger *et al.*, 2011) en erlenmeyer de 1 l à une concentration protéique de 15 µg de protéines/ml. À moins d'avis contraire dans les sections suivantes, ces dernières ont été incubées 56 jours à 30 °C, en conditions statiques, à l'obscurité.

Pour permettre une différenciation cellulaire, les souches étudiées ont également été inoculées dans 400 ml de milieux BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 et BAPS KCl 40 mM pH 5,85 en erlenmeyer de 1 l à une concentration protéique de 5 µg/ml. À moins d'avis contraires dans les sections suivantes, les cultures ont été incubées 56 jours à température pièce, en conditions statiques, à l'obscurité. Ces milieux contiennent toutes les constituantes du milieu BAPS. Le milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 contient 5 fois la concentration de KH_2PO_4 normalement retrouvée dans le milieu BAPS et son pH est de 5,85 avant autoclave plutôt que 6,7. Le milieu BAPS KCl 40 mM contient, en plus des constituantes du milieu BAPS, 2,98 g/l de KCl et son pH est de 5,85 avant autoclave plutôt que 6,7. Pour l'expérience décrite à la section 2.2.9, 50 ml de milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 ont été inoculés en erlenmeyer de 125 ml. Les souches étudiées ont également été inoculées en plaques 96 puits standards en milieu BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7. Ce milieu contient toutes les composantes du milieu BAPS, mais contient dix fois la concentration de propionate de sodium normalement retrouvée dans ce milieu. L'utilisation de la microplaque a été essentielle, puisque ce milieu d'induction

n'a jusqu'à présent pas permis la différenciation cellulaire massive en erlenmeyer. Trois microplaques ont été préparées pour permettre un suivi sur huit semaines. Chaque puits contenait 150 µl de milieu BAPS 1,33x succinate de sodium 66,5 mM pH 6,7 et 50 µl d'inoculum pour un volume total de 200 µl. La concentration protéique finale était de 15 µg/ml dans chacun des puits. Les microplaques ont été scellées avec du parafilm et incubées pour 56 jours à la noirceur, à température pièce, dans un bac de plastique fermé et scellé avec une membrane de parafilm. Un b cher contenant de l'eau distillée stérile a été placé dans ces bacs pour limiter l'évaporation durant l'incubation.

2.2.4 Suivi des cultures et traitement des échantillons

Pour chacune des cultures, à moins d'avis contraire dans les sections suivantes, des prélèvements ont été réalisés sur une période de huit semaines. La fréquence des prélèvements diffère d'une expérience à l'autre et sera donc décrite davantage dans les sections 2.2.7 à 2.2.10. Pour les cultures en plaques 96 puits, le contenu de plusieurs puits a été combiné afin d'obtenir un volume minimal de 1 à 2 ml. Lorsqu'inférieurs à 2 ml, les volumes de culture ont été centrifugés à 17000 x g durant 5 minutes à 4  C et lorsque supérieurs à 2 ml, ces derniers ont été centrifugés à 3440 x g durant 10 minutes à 4  C. Le surnageant a ensuite été récolté et filtré à l'aide d'une seringue munie d'un filtre 0.22 µm, puis conservé à -80  C. Les extraits de surnageant filtrés ont ensuite été concentrés à l'acétate d'éthyle et la phase aqueuse générée a été concentrée par lyophilisation tel que décrit à la section 2.2.5. Une observation des pourcentages de viabilité et de RTH des cellules culot es, ainsi qu'une observation de l'apparence des hyphes a été effectuée en microscopie à épifluorescence tel que décrit à la section 2.2.2.

2.2.5 Concentration des surnageants

Les extraits de surnageant ont été concentrés à l'acétate d'éthyle. La méthode décrite dans le présent mémoire a été inspirée de Fugère *et al.* (2014). Brièvement, dans une bouteille de verre, un volume équivalent d'acétate d'éthyle (141-78-6, Sigma, Ontario, CA) a été ajouté au volume de surnageant de culture filtré. Après avoir été vortexés vigoureusement, les échantillons ont été laissés reposer jusqu'à l'apparition de deux phases distinctes. La phase organique a été transférée dans une nouvelle bouteille de verre et la phase aqueuse a été récoltée et conservée à -80 °C dans un tube 15 ml pour une concentration ultérieure. Un volume d'acétate d'éthyle équivalent au volume de phase organique récolté a ensuite été ajouté à ce dernier, puis l'échantillon a été vortexé rigoureusement. L'échantillon a ensuite été évaporé via un jet d'azote jusqu'à l'apparition d'un précipité au fond du tube. Les parois du tube de verre ont été lavées et le précipité suspendu à l'aide de DMSO (67-68-5, Sigma, Ontario, CA) pour permettre de concentrer 20X. La phase aqueuse entreposée à -80 °C a été concentrée par lyophilisation à l'aide de l'appareil 24DX24 (*The Virtis Company, inc.*, Gardiner, NY). L'appareil a été utilisé selon les indications du fournisseur. Suite à l'obtention d'un précipité poudreux au fond du tube, les parois du tube ont été lavées et le précipité suspendu dans de l'eau distillée stérile selon un volume identique à celui employé pour la suspension du culot de la phase organique dans le DMSO. Les échantillons ont été conservés à -80 °C.

2.2.6 Antibiogrammes par la technique de diffusion en agar

La procédure employée ci-bas a été inspirée des standards établis par le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2006; *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2009). Pour chacune des souches employées, des cultures en boîtes de Pétri étaient conservées à 4 °C pour un maximum de 7 jours. Pour la majorité des souches, les géloses utilisées étaient des Mueller-Hinton II (g/l) : Mueller Hinton II Broth Cation-Adjusted (212322, *BD*, Ontario, CA), 22; agar bactériologique, 15. Pour *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* et les *Streptococcus* sp., des géloses TSA supplémentées de 5 % de sang de mouton (TSA 5 % SB) (215372, *BD*,

Ontario, CA) ont été utilisées . Pour permettre l'obtention de colonies, les géloses ont été incubées durant 16 à 24 h à 37 °C, les streptocoques ont été incubés en présence de 5 % de CO₂. À l'exception de *C. albicans* et *Streptococcus* sp., la veille de l'essai, une portion de deux à trois colonies de chacune des souches a été inoculée dans 5 ml de bouillon Mueller Hinton II (212322, BD, Ontario, Canada) 22 g/l. Les cultures en bouillon ont été incubées 20 h à une température de 37 °C sous agitation à 225 RPM. Le jour de l'expérience, un inoculum d'une turbidité équivalente à un MacFarland 0,5 a été préparé à partir des cultures en bouillon dans du PBS 1x (g/l) : chlorure de sodium, 8,5; sodium phosphate monobasique, 1,07; sodium phosphate dibasic anhydre, 0,39 g. Pour *C. albicans* et *Streptococcus* sp., le MacFarland a été préparé à partir de colonies fraîchement obtenues sur gélose TSA 5 % SB. Il est à noter qu'afin d'obtenir un tapis assez dense, un MacFarland 1,0 plutôt que 0,5 a été préparé pour *C. albicans*. Un tapis bactérien a été réalisé pour chacune des souches à l'aide d'un écouvillon stérile sur milieu Mueller-Hinton II gélosé. Le milieu TSA 5 % SB plutôt que Mueller-Hinton II a été employé pour *Listeria monocytogenes* et *Streptococcus* sp. et un milieu Mueller-Hinton II supplémenté de 2 % de glucose et de 0.5 µg/ml de bleu de méthylène a été employé pour *C. albicans*. Des puits ont ensuite été percés dans la gélose à l'aide d'un poinçon stérile de 4 mm de diamètre, puis 20 µl de chacun des échantillons à tester ont été déposés par puits. Des contrôles des milieux de culture (phase organique ou aqueuse concentrée, selon le cas), un contrôle positif de 1 µg d'érythromycine (204-040-1, Sigma, Ontario, Canada) dissous dans de l'éthanol 70 %, ainsi qu'un contrôle négatif (eau distillée stérile ou DMSO, selon le cas) ont également été déposés. Le contrôle positif d'érythromycine a seulement été employé avec les souches *E. coli* MC4100 *imp4213*, *E. coli* MC4100 *acrAB* et *B. subtilis* ATCC6633. Une fois l'échantillon entièrement diffusé dans la gélose, les boîtes de Pétri ont été incubées en position inversée, durant une période de 18 h à une température de 37 °C. Les souches de streptocoques ont été incubées en présence de 5 % de CO₂ et *C. albicans* a été incubée 48 h plutôt que 18 h pour permettre l'obtention d'un tapis suffisamment dense. Les zones d'inhibition ont par la suite été mesurées à l'aide d'une règle, sans soustraire la valeur correspondant au diamètre du puits. Si aucune zone d'inhibition n'était présente, la mesure de la zone d'inhibition était considérée comme étant 0. Les géloses ont été numérisées à l'aide de l'appareil Epson Perfection 4490 Photo (Epson Canada, Ontario, CA).

Un premier criblage du potentiel antimicrobien des extraits de surnageant de culture a été effectué à l'aide des souches indicatrices *E. coli* MC4100 *imp4213* (Sampson *et al.*, 1989) et *E. coli* MC4100 *acrAB* (Mazzariol et Cornaglia, 2000), gracieusement fournies par le Pr Hiroshi Nikaido (University of California, Berkeley, Canada), ainsi que *B. subtilis* ATCC6633. Ces trois souches étant sensibles à une variété d'antibiotiques, leur utilisation visait augmenter les probabilités de détecter la présence de composés antimicrobiens. L'emploi du mutant hyperperméable *E. coli* MC4100 *imp4213* visait augmenter la possibilité de détecter la présence d'antibiotiques actifs envers les bactéries à Gram négatif et dont l'entrée est normalement bloquée par la membrane externe. L'utilisation du mutant de pompe à efflux *E. coli* MC4100 *acrAB* avait pour objectif d'augmenter la probabilité de détecter des antibiotiques actifs envers les bactéries à Gram négatif, mais dont la détection peut parfois s'avérer difficile en raison de leur expulsion à l'extérieur de la cellule via les pompes à efflux. Finalement, l'emploi de *B. subtilis* ATCC6633 visait augmenter les probabilités de détecter des molécules actives envers les bactéries à Gram positif. Selon la sensibilité des souches testées, un second essai d'antibiogramme a été effectué avec les mêmes extraits envers *C. albicans* ATCC10231, afin d'évaluer leur potentiel antifongique, et envers d'autres souches d'importance clinique à Gram positif et/ou à Gram négatif, selon le cas, dans le but de démontrer un potentiel biosynthétique contre des souches d'intérêt clinique. À moins d'indications contraires, la banque de souches à Gram négatif testées comprenait *E. coli* MC4100 ATCC35695, *P. aeruginosa* ATCC27853, *Citrobacter freundii* ATCC8090, *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, *Proteus mirabilis* ATCC25933 et *A. baumannii* ATCC1960, et les souches à Gram positif testées étaient *Listeria monocytogenes* ATCC13932, *Streptococcus pyogenes* ATCC19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619, *Streptococcus agalactiae* ATCC27956, *S. aureus* ATCC29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 et *Enterococcus faecium* ATCC35667. Lors du deuxième essai d'antibiogramme, les souches indicatrices ayant présenté des zones d'inhibition de croissance lors du premier essai ont été testées de nouveau afin de confirmer la stabilité du potentiel antimicrobien des extraits de surnageant, suite à leur entreposage à - 80 °C.

2.2.7 Nombre de passages et concentration protéique des précultures (Paramètre A)

Dans le but d'évaluer l'effet sur la différenciation en hyphes toruleux du nombre de passages d'une préculture et de la concentration protéique à laquelle cette dernière est repiquée avant de démarrer l'expérience, le schéma expérimental suivant a été suivi (figure 6). Une préculture a été repiquée une fois à une concentration protéique approximative (protocole standard, ~ 15 à 20 µg/ml), une fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml et deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml afin de générer l'inoculum. Ces manipulations ont été effectuées avec la souche ACN14a, les souches ACN14a et ACN10a, et les souches ACN14a et ACN10a, respectivement. Suivant ces manipulations, les cellules ont été homogénéisées à la seringue puis plongées en milieux BAPS, BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85, BAPS KCl 40 mM pH 5,85 et BAPS propionate de sodium pH 6,7. Des prélèvements ont été réalisés 5 jours par semaine durant 8 semaines et des observations microscopiques ont été réalisées de deux à trois fois par semaine. Le potentiel antimicrobien d'échantillons de surnageant espacés de 2 à 4 jours a été évalué via un essai d'antibiogramme. Le potentiel antimicrobien des échantillons de l'expérience schématisée dans la portion gauche de la figure 6 a été évalué envers *E. coli* MC4100 *imp4213* et *B. subtilis* ATCC6633, et celui des échantillons des expériences schématisées dans les portions centrale et de droite de la figure 6 a été évalué envers *E. coli* MC4100 *imp4213*, *E. coli* MC4100 *acrAB* et *B. subtilis* ATCC6633, *E. faecalis* ATCC29212, *P. aeruginosa* ATCC27853 et *S. aureus* ATCC29213. Par manque d'espace, un seul réplica de chacune des expériences a pu être mené à terme.

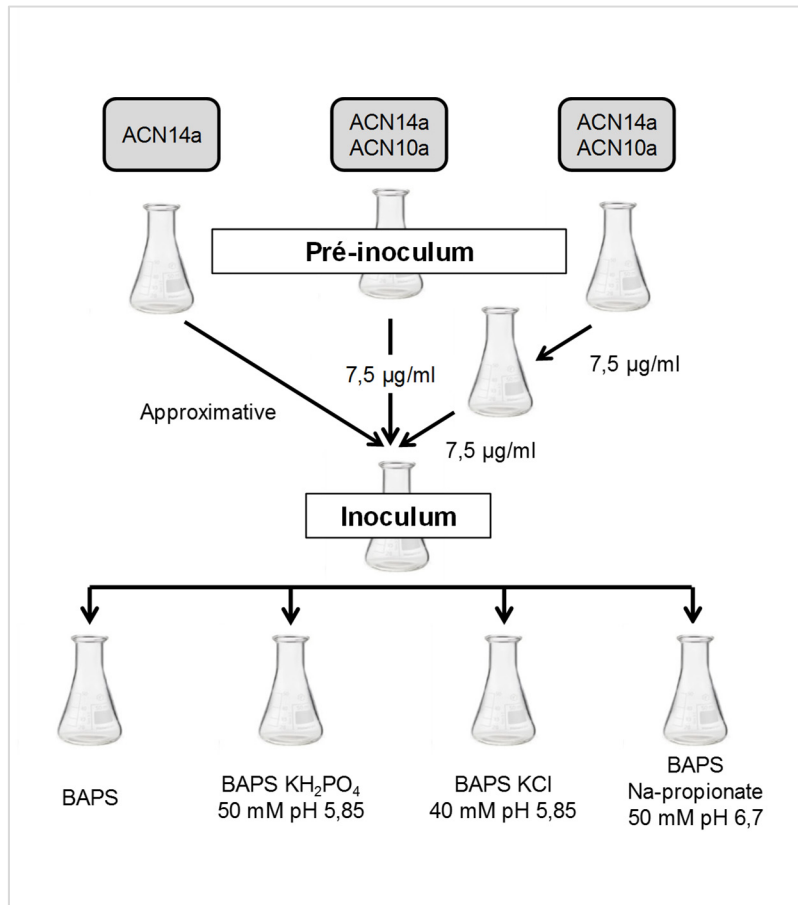


Figure 6 : Schéma expérimental ayant permis d'évaluer l'effet, sur la différenciation en RTH, du nombre de passages des précultures et de la concentration protéique à laquelle les précultures sont repiquées (Paramètre A). Les portions de gauche et du centre représentent une préculture repiquée une fois à une concentration protéique approximative et à 7,5 µg/ml de protéines, respectivement. La portion de droite représente une préculture repiquée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml avant de démarrer l'expérience.

2.2.8 Absence d'homogénéisation de l'inoculum (Paramètre B)

Dans le but d'évaluer l'effet de l'absence d'homogénéisation d'un inoculum sur la capacité des hyphes à se différencier, le schéma expérimental suivant a été suivi (figure 7). Les cellules

d'une préculture d'ACN14a et d'ACN10a ont été passées trois fois sans homogénéisation préalable de l'inoculum, les centrifugations ont été effectuées à une vitesse de 2580 x g pour une durée de 4 minutes à une température de 4 °C. Lors de chacun des passages, un milieu de différenciation BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 a été inoculé pour chaque souche sans homogénéisation préalable de l'inoculum. Il est connu que la viabilité cellulaire est particulièrement faible chez la souche ACN10a dans ce milieu. Lafond-Lambert (2014) avait démontré une viabilité cellulaire plus élevée chez cette souche en milieu BAPS KH_2PO_4 25 mM pH 5,85 lorsqu'évalué en plaques 96 puits. Un milieu BAPS KH_2PO_4 25 mM pH 5,85 a donc également été inoculé pour la souche ACN10a. Les cultures en milieu de différenciation et en milieu BAPS ont été suivies durant 14 jours. Des prélèvements ont été effectués aux jours 4, 8 et 14 pour chacune des cultures. Des essais d'antibiogramme ont été effectués envers les trois souches indicatrices et l'ensemble des souches à Gram positif énumérées à la section 2.2.6. Due à une contrainte opérationnelle, un seul réplica d'expérience a été effectué.

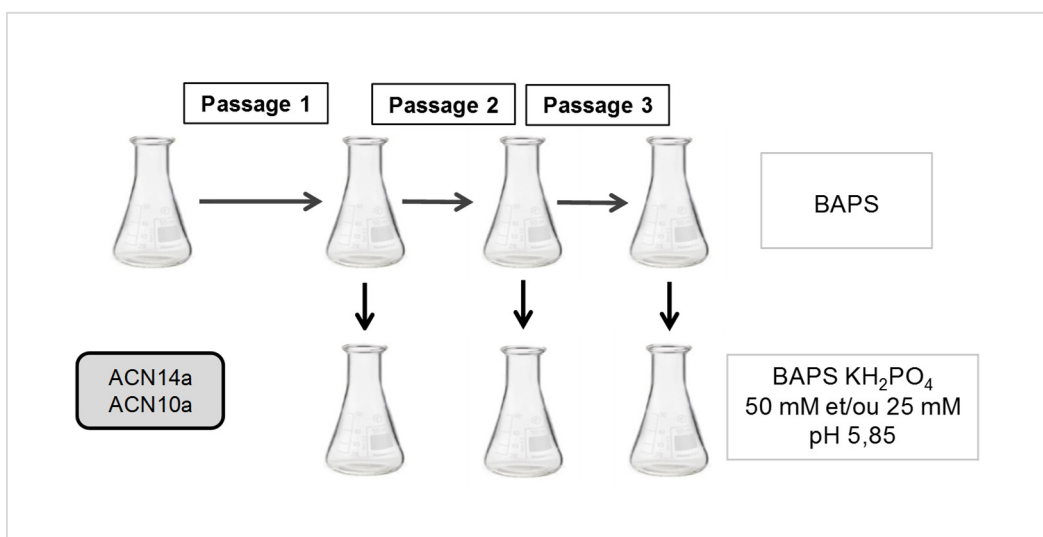


Figure 7 : Schéma expérimental ayant permis d'évaluer l'effet de l'absence d'homogénéisation d'un inoculum sur la différenciation en RTH (Paramètre B). Une culture d'ACN14a et d'ACN10a est passée trois fois sans homogénéisation préalable de l'inoculum. À chacun des passages, un milieu de différenciation BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 (pour ACN14a et ACN10a) et un milieu de différenciation BAPS KH_2PO_4 25 mM pH 5,85 (pour ACN10a seulement) sont inoculés.

2.2.9 Concentration protéique d'une préculture et degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue (Paramètre C)

Dans le but d'évaluer l'effet, sur la capacité des hyphes à se différencier, de différentes concentrations protéiques d'une préculture et du degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue, le schéma expérimental suivant a été suivi (figure 8). À partir d'une préculture d'ACN14a, trois milieux BAPS ont été inoculés à une concentration protéique de 7,5 µg/ml, de 15 µg/ml ou à une concentration protéique approximative (~ 5 µg/ml). Les cultures résultantes ont été incubées 2 semaines (tel que décrit dans la section 2.2.2) pour générer les inocula. Le jour de l'expérience, la biomasse de chacun des inocula a été homogénéisée 0, 5, 10 ou 20 coups de piston à la seringue avant d'être plongée dans 50 ml de milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85. Des prélèvements ont été effectués aux jours 14, 28 et 56 en milieu de différenciation. Des essais d'antibiogramme ont été effectués envers les trois souches indicatrices.

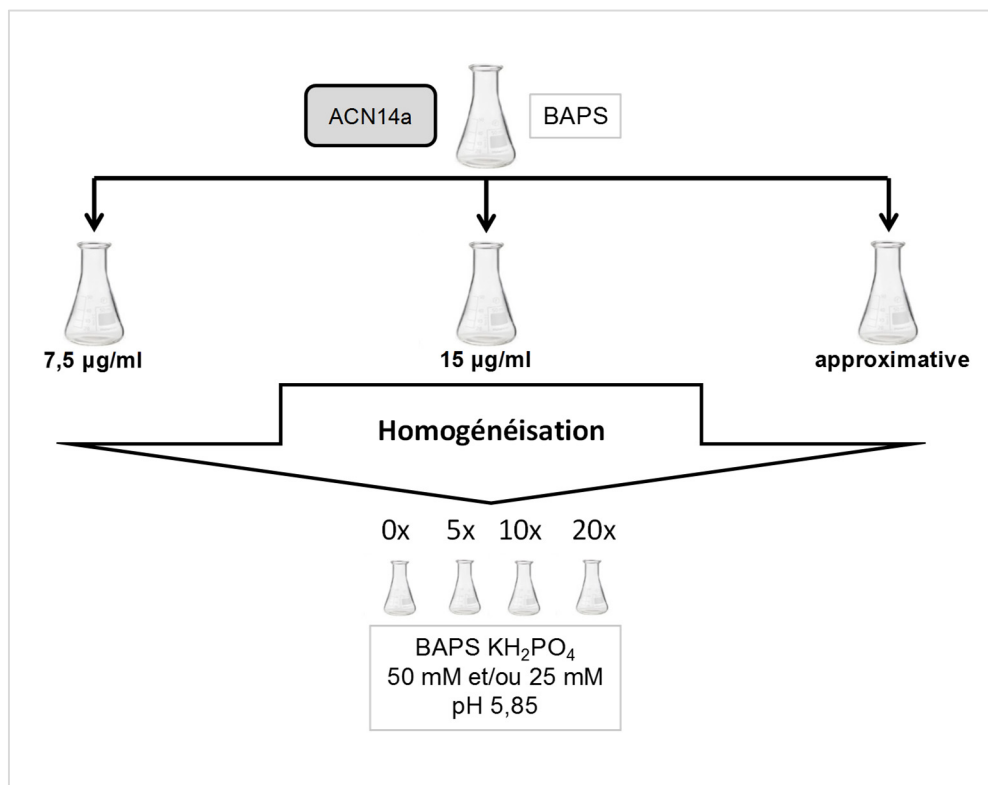


Figure 8 : Schéma expérimental ayant permis d'évaluer l'effet, sur la différenciation en RTH, de la concentration protéique d'une préculture et du degré d'homogénéisation d'un inoculum à la seringue (Paramètre C). À partir d'une culture d'ACN14a, trois milieux BAPS sont inoculés à une concentration protéique de 7,5 et 15 µg/ml ainsi qu'à une concentration protéique approximative, générant ainsi les inocula. La biomasse de chaque inoculum est homogénéisée 0, 5, 10 ou 20 coups de piston à la seringue avant d'être plongée en milieu BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85. 0x, 5x, 10x et 20x : 0, 5, 10 ou 20 coups de piston.

2.2.10 Âge de l'inoculum (Paramètre D)

Afin d'évaluer l'effet de l'âge d'un inoculum sur la capacité des hyphes à se différencier, trois milieux BAPS ont été inoculés avec la souche ACN14a à une concentration protéique de 15 µg/ml (standard au laboratoire pour les expériences en milieu BAPS). Les cultures résultantes ont été incubées 2, 4 ou 8 semaines pour générer les inocula. À partir de chacun

des inocula, un milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 a été ensemencé. Trois réplicas d'expérience ont été réalisés. Des prélèvements ont été effectués aux jours 4, 8, 14, 28, 42 et 56. Des essais d'antibiogramme ont été effectués envers les trois souches indicatrices et les souches à Gram positif énumérées à la section 2.2.6. Pour l'inoculum âgé de 4 semaines, le potentiel antimicrobien des échantillons de phase organique a aussi été évalué contre les souches à Gram négatif énumérées à la section 2.2.6.

2.3 Résultats

2.3.1 Optimisation de la méthode d'induction de la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH chez *Frankia* spp.

2.3.1.1 Effet du nombre de passages et de la concentration protéique des précultures chez *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a (Paramètre A)

Une expérience a été effectuée dans le but d'évaluer l'effet, sur la différenciation cellulaire, du nombre de passages et de la concentration protéique à laquelle les précultures sont inoculées durant ces repiquages. Lors de cette expérience, des précultures ont été passées une fois à une concentration protéique approximative (ACN14a) et une ou deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml (ACN14a et ACN10a).

Préculture sous-cultivée à une concentration protéique approximative (A1)

Chez la souche ACN14a, lorsque la préculture était inoculée à une concentration protéique approximative, aucune différenciation cellulaire massive n'était observée en milieu BAPS durant les 8 semaines de suivi (figure 9A), seuls des hyphes végétatifs ont été observés

(figure 10A). Tel qu'attendu, une différenciation cellulaire massive vers le morphotype RTH était perçue dès le jour 14 pour les trois milieux d'induction employés (figures 9B-D et 10B-D). En milieu BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7, le processus de différenciation semblait légèrement ralenti, la valeur du pourcentage de RTH étant de 70 % plutôt que 90 % au jour 14 (figures 9D). Il est à noter que le pourcentage de RTH diminuait drastiquement au jour 47 en milieu BAPS KCl 40 mM pH 5,85 lorsqu'on comparait avec les milieux contenant le KH_2PO_4 et le propionate de sodium comme agents inducteurs (figure 9B-D). En milieu BAPS propionate de sodium 50 mM pH 5,85 le pourcentage de RTH observé diminuait très graduellement du jour 36 au jour 54, passant de 100 % à 80 % (figure 9D).

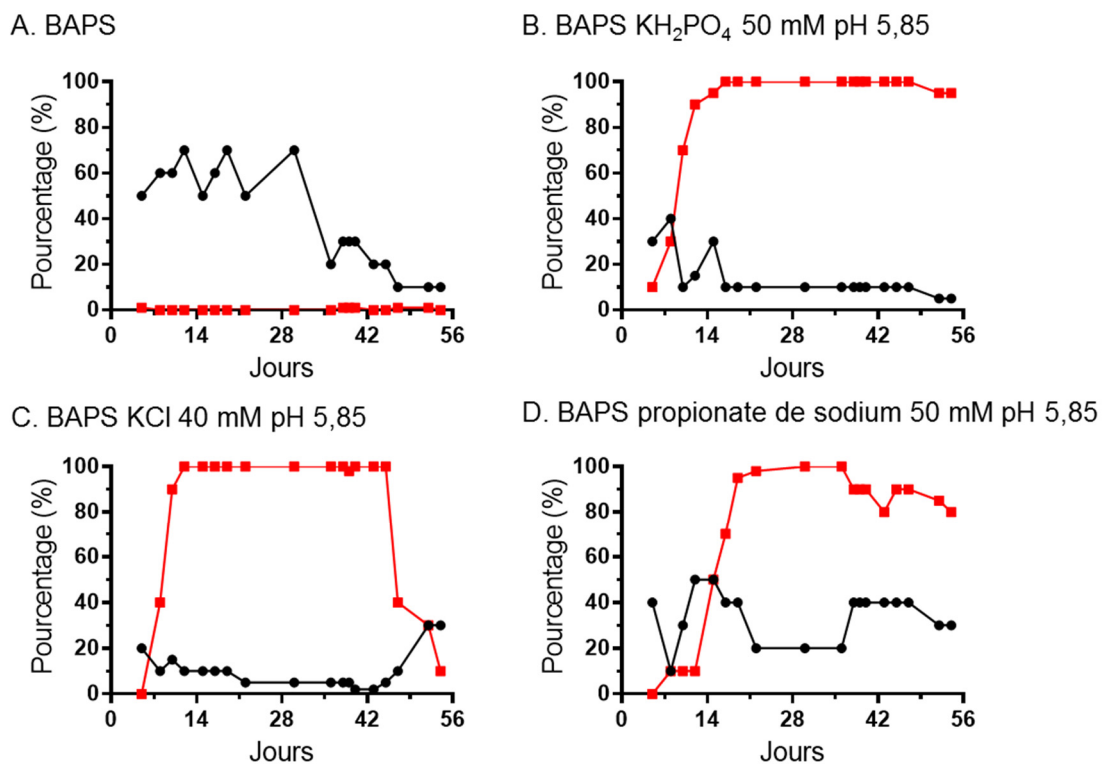


Figure 9 : Observations microscopiques des pourcentages de viabilité (●) et de RTH (■) chez des cultures d'ACN14a dont la préculture était inoculée à une concentration protéique approximative. Les pourcentages pour les différentes conditions de culture ont été déterminés à l'œil par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules au *LIVE/DEAD*®.

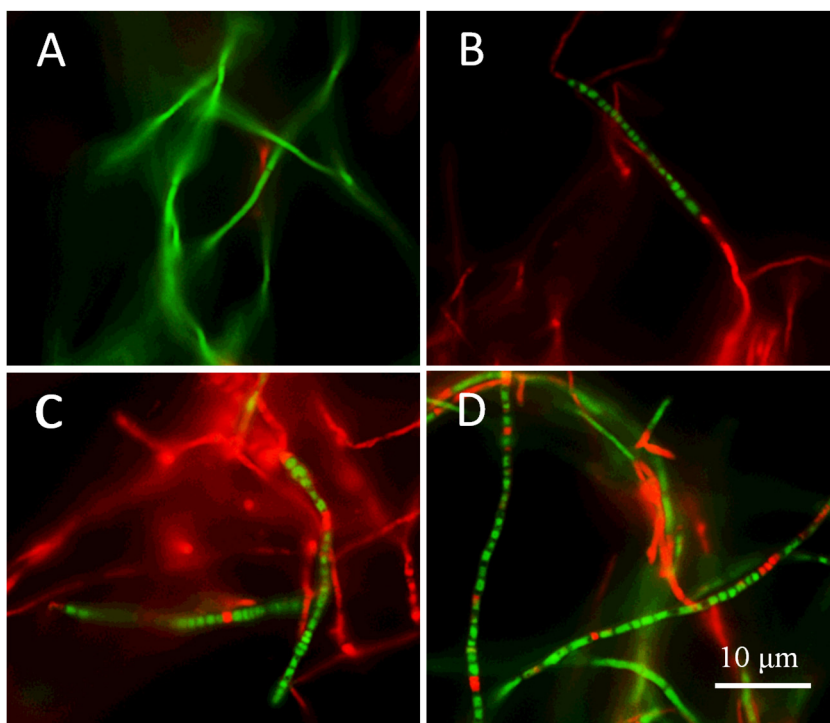


Figure 10 : Morphologies cellulaires observées chez la souche ACN14a après 14 jours d'incubation en milieux BAPS (A), BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 (B), BAPS KCl 40 mM pH 5,85 (C) et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 (D), lorsque la préculture était inoculée à une concentration protéique approximative. Les observations ont été réalisées par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules au colorant *LIVE/DEAD*®.

Préculture passée une fois à 7,5 μg de protéines/ml (A2)

Lorsqu'une préculture d'ACN14a était repiquée une fois à une concentration protéique de 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ on observait, tout comme pour une préculture repiquée à une concentration protéique approximative, une absence de différenciation cellulaire vers le morphotype RTH en condition BAPS (résultats non montrés). Une différenciation cellulaire massive vers le morphotype toruleux était observée après 14 jours d'incubation en milieux inducteurs, le pourcentage de RTH se situant entre 95 et 100 % dans chacune des conditions (figure 11A-C). En milieux BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 la différenciation

cellulaire massive vers le morphotype toruleux restait soutenue durant les 8 semaines d'incubation (figure 11A et C). Au contraire, en milieu BAPS KCl 40 mM pH 5,85, lorsque la préculture était inoculée une fois à 7,5 µg de protéines/ml, le pourcentage de RTH chutait drastiquement du jour 22 au jour 54, passant de 95 % à 0 % (figures 11B et 12B). Suivant une incubation de longue durée en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, on observait régulièrement, chez la souche ACN14a, une augmentation de la taille des propagules individuelles que constituent le RTH. Les observations microscopiques réalisées dans le cadre de cette expérience ont démontré que les propagules augmentaient en taille aux alentours du jour 30, ces dernières étant auparavant identiques à celles observées en milieu avec KCl et propionate de sodium (figure 12A et C).

Tout comme chez la souche ACN14a, aucune différenciation cellulaire vers le morphotype RTH n'était observée en condition BAPS chez les cultures d'ACN10a dont la préculture avait été repiquée une fois à 7,5 µg de protéines/ml (figure 12D). Au contraire de ce qu'il a pu être observé chez la souche ACN14, aucune différenciation cellulaire vers le morphotype RTH n'a été observée en milieux inducteurs chez la souche ACN10, confirmant les résultats obtenus par Gagnon (2015). Malgré tout, une certaine différenciation des hyphes a pu être observée en conditions inductrices. Cette dernière se manifestait principalement par la présence de renflements sur les hyphes et par la présence sporadique de vésicules en milieux inducteurs (figure 12E, F et G). La viabilité des cellules d'ACN10a en milieu BAPS était faible lorsqu'on comparait avec celle observée chez la souche ACN14a dans le même milieu de culture. La différenciation cellulaire atypique observée chez la souche ACN14a semblait accompagnée d'une mortalité encore plus élevée des cellules en milieux inducteurs, la viabilité des cellules étant particulièrement faible en milieux BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 et BAPS KCl 40 mM pH 5,85. Suivant 17 jours d'incubation dans ces deux milieux inducteurs, les cultures d'ACN10a présentaient un pourcentage de viabilité de 3 %, et ce, jusqu'au jour 54 (figure 13).

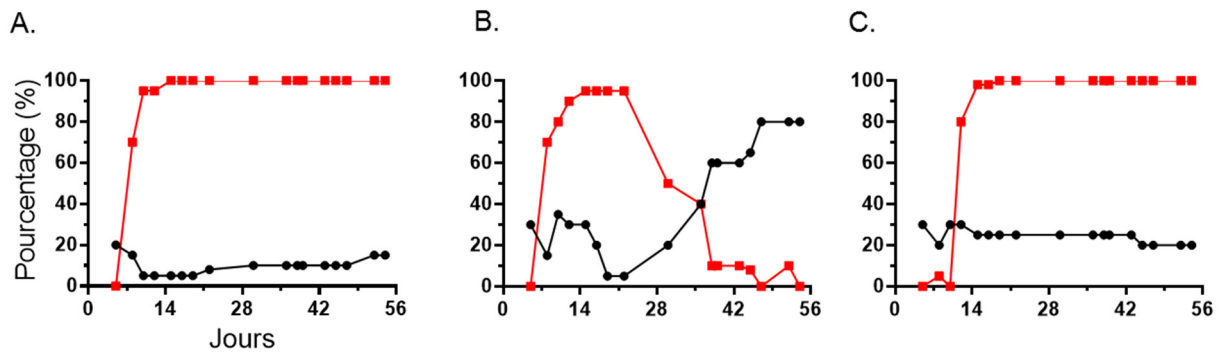


Figure 11 : Observations microscopiques des pourcentages de viabilité (●) et de RTH (■) chez des cultures d'ACN14a dont la préculture avait été inoculée une fois à une concentration protéique de 7,5 $\mu\text{g/ml}$. Les pourcentages en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 (A), BAPS KCl 40 mM pH 5,85 (B) et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 (C) ont été déterminés à l'œil par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules avec le colorant *LIVE/DEAD*®.

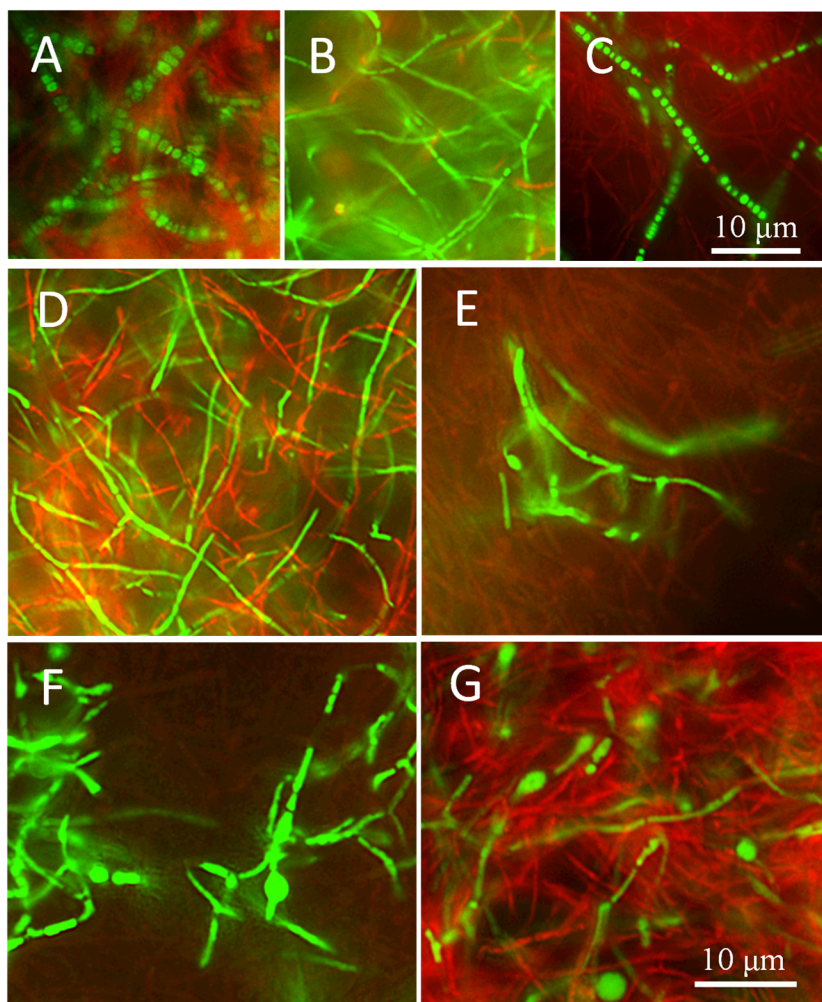


Figure 12 : Morphologies cellulaires observées chez ACN14a et ACN10a lorsque la préculture avait été inoculée une fois à une concentration protéique de 7,5 $\mu\text{g/ml}$, suivant 54 jours et 30 jours d'incubation dans différentes conditions, respectivement. Cultures d'ACN14a en milieux BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 (A), BAPS KCl 40 mM pH 5,85 (B) et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 (C) et d'ACN10a en milieux BAPS (D), BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 (E), BAPS KCl 40 mM pH 5,85 (F) et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 (G). Les observations ont été réalisées par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules au *LIVE/DEAD*®.

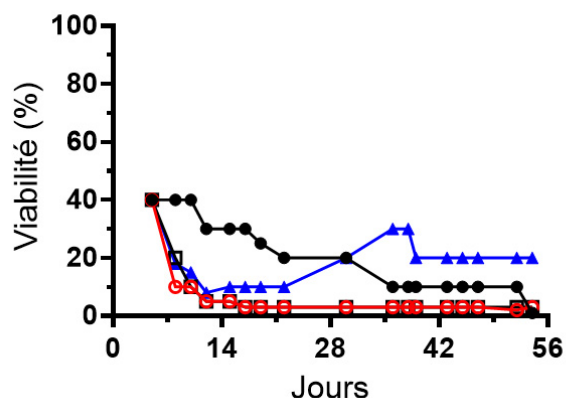


Figure 13 : Pourcentages de viabilité de cultures d'ACN10a dont la préculture avait été inoculée une fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml. Les pourcentages de viabilité en condition BAPS (●), BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 6,7 (○), BAPS KCl 40 mM pH 5,85 (□) et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 (▲) ont été déterminés à l'œil par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules avec le colorant *LIVE/DEAD*®.

Préculture passée deux fois à 7,5 µg de protéines/ml (A3)

Tel qu'attendu, lorsqu'une préculture d'ACN14a était passée deux fois à une concentration de 7,5 µg de protéines/ml, il y avait absence de différenciation vers le morphotype toruleux en milieu BAPS régulier (résultats non montrés). Au contraire de ce qu'il a pu être observé auparavant chez la souche ACN14a, lorsque la préculture était passée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml, les pourcentages de RTH et de viabilité devenaient très variables durant les 8 semaines d'incubation en milieux inducteurs. À titre d'exemple, en condition BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85, le pourcentage de RTH diminuait de 85 % au jour 9 à 2 % au jour 37 pour finalement augmenter à 40 % au jour 46 (figures 14 et 15A-C). Se référer à l'annexe 1 pour les graphiques concernant les observations microscopiques en milieux BAPS KCl 40 mM pH 5,85 et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7. La variation du pourcentage de RTH observé durant les 8 semaines d'incubation en conditions inductrices s'avérait un résultat différent de ce qui avait pu être observé pour une préculture repiquée à une concentration protéique approximative ou une fois à 7,5 µg de protéines/ml, pour lesquelles le

pourcentage de RTH s'avérait plutôt stable durant les 8 semaines d'incubation en conditions inductrices.

Lorsqu'une préculture d'ACN10a était passée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml, aucune différenciation cellulaire massive n'était observée en milieu BAPS, tel qu'attendu (résultats non montrés). Tout comme pour une préculture repiquée une seule fois à 7,5 µg de protéines/ml, aucune différenciation cellulaire vers le morphotype toruleux n'a été observée en conditions inductrices. Malgré tout, tel qu'observé précédemment, les hyphes arboraient certaines portions arrondies ou bombées, mais sans être qualifiés de RTH. Ceci était particulièrement observé en milieu BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 (figure 15F). En milieux BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 et BAPS KCl 40 mM pH 5,85 des sporanges intercalaires ont souvent été observés durant les 8 semaines d'incubation en plus des structures bombées qu'arboraient les hyphes (figures 15D et E).

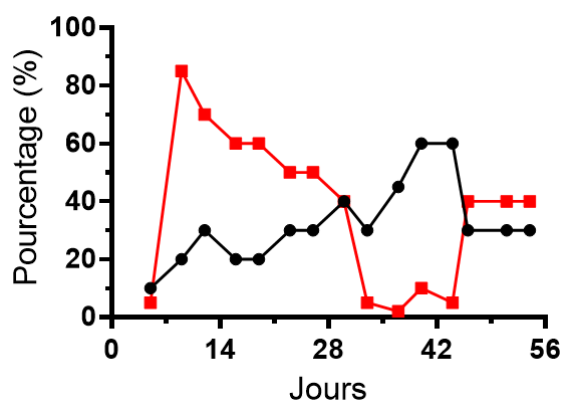


Figure 14 : Observations microscopiques des pourcentages de viabilité (●) et de RTH (■) d'une culture d'ACN14a en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, dont la préculture avait été passée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml. Les pourcentages de viabilité et de RTH pour les différentes conditions de culture ont été déterminés à l'œil par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules avec le colorant *LIVE/DEAD*®.

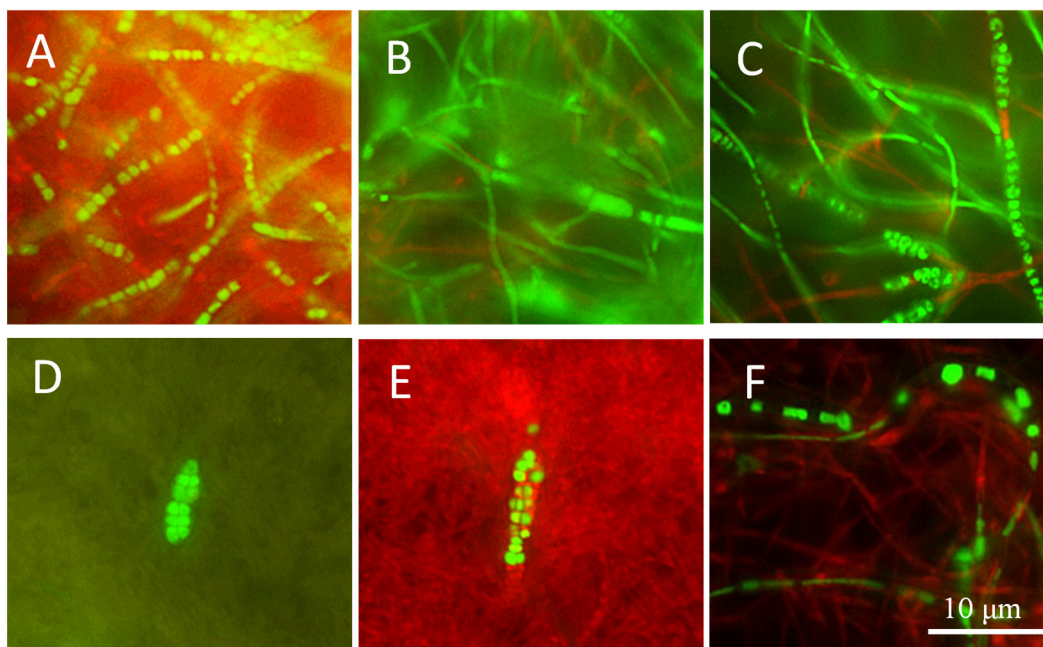


Figure 15 : Morphologies cellulaires observées chez les souches ACN14a et ACN10a lorsque la préculture était inoculée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml. Cultures d'ACN14a après 9 jours (A), 37 jours (B) et 46 jours (C) d'incubation en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 et cultures d'ACN10a après 30 jours d'incubation en milieux BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 (D), BAPS KCl 40 mM pH 5,85 (E) et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 (F). Les observations ont été réalisées par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules au *LIVE/DEAD*®.

2.3.1.2 Effet d'une absence d'homogénéisation de l'inoculum chez *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a (Paramètre B)

Les observations microscopiques réalisées tout au long de l'expérience ont démontré une absence de différenciation cellulaire vers le morphotype toruleux chez la souche ACN14a en milieu BAPS, mais également en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 (figure 16A et B). Le même phénomène a été répertorié durant toute la durée de l'expérience chez la souche ACN10a en milieux BAPS et BAPS modifiés contenant 25 et 50 mM de KH_2PO_4 (figure 16C, D

et E). De façon générale, les pourcentages de viabilité chez les souches ACN14a et ACN10a en milieux inducteurs contenant 50 et 25 mM de KH_2PO_4 , respectivement, se rapprochaient davantage à ce qui peut normalement être observé en milieu BAPS (80-90 % de viabilité) (figure 16A-C et E). Les observations microscopiques répertoriées durant toute la durée de l'expérience ont démontré que le nombre de passages sans homogénéisation des cultures ne semblait pas affecter les pourcentages de viabilité et de RTH et les morphologies observées. Chez la souche ACN10a, les pourcentages de viabilité observés en milieu contenant 50 mM de KH_2PO_4 étaient très bas, la morphologie cellulaire majoritairement observée restait tout de même l'hyphe végétatif (figure 16D). Chez ACN14a, un épaississement progressif des hyphes, une augmentation du nombre de septations ainsi qu'une réallocation du matériel génétique dans les hyphes étaient observés en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85. Une présence plus élevée de sporange avait également été observée (figure 16B). Tel qu'illustré à la figure 16, le milieu BAPS contenant 25 mM de KH_2PO_4 semblait promouvoir une viabilité plus élevée des cultures d'ACN10a lorsqu'on la comparait avec celle observée en milieu BAPS contenant 50 mM de KH_2PO_4 . Ce même milieu semblait également promouvoir une différenciation cellulaire plus évidente chez ACN10a, celle-ci se traduisant par un élargissement des hyphes ainsi que par l'apparition de structures bombées à plusieurs endroits sur les hyphes (figure 16E).

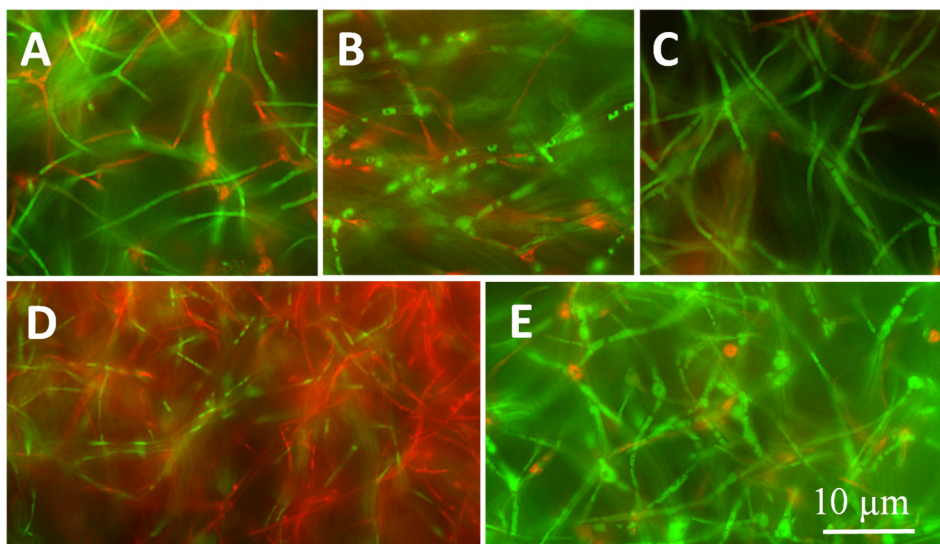


Figure 16 : Morphologies cellulaires observées chez les souches ACN14a et ACN10a suivant 14 jours d'incubation en milieux BAPS et inducteurs, pour des précultures passées successivement trois fois sans homogénéisation de l'inoculum. (A) ACN14a en milieu BAPS, (B) ACN14a en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, (C) ACN10a en milieu BAPS, (D) ACN10a en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, (E) ACN10a en milieu BAPS KH_2PO_4 25 mM pH 5,85. Les observations ont été réalisées par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules au *LIVE/DEAD*®.

2.3.1.3 Effet de la concentration protéique d'une préculture et du degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue chez *Frankia alni* ACN14a (Paramètre C)

La concentration protéique à laquelle une préculture d'ACN14a est repiquée semble influencer la capacité subséquente des hyphes à se différencier en milieu inducteur. À des concentrations protéiques de 7,5 $\mu\text{g/ml}$ et approximative, la différenciation cellulaire vers l'hyphe toruleux augmentait au jour 14 jusqu'à des valeurs se situant entre 70 et 90 % au jour 28 pour ensuite diminuer à des pourcentages allant de 10 à 50 % au jour 56. Une concentration protéique de 15 $\mu\text{g/ml}$ combinée avec une homogénéisation de 10 ou 20 coups de pistons permettait une

différenciation cellulaire massive et soutenue vers le morphotype RTH durant les 8 semaines d'incubation. En moyenne, 95 % des cellules étaient différenciées vers le morphotype RTH au jour 28 et ce pourcentage est resté stable jusqu'à la fin de l'expérience. Plus la concentration protéique des précultures et le degré d'homogénéisation à la seringue augmentaient, plus un effet marqué de ces paramètres était observé. Avec une augmentation de la concentration protéique des précultures et une augmentation du degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue s'ensuit une augmentation de la capacité des hyphes à se différencier et de manière soutenue dans le temps (résultats non montrés).

2.3.1.4 Effet de l'âge de l'inoculum chez *Frankia alni* ACN14a (Paramètre D)

Chez la souche ACN14a, l'augmentation de l'âge d'un inoculum semble entraîner une augmentation de la variabilité des pourcentages de RTH observés d'un réplica à l'autre. Tel qu'illustré à la figure 17, le pourcentage de cellules différenciées en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 variait très peu pour un inoculum âgé de 2 semaines, légèrement pour un inoculum âgé de 4 semaines et s'avérait très variables et non reproductibles pour un inoculum âgé de 8 semaines. Pour un inoculum âgé de 8 semaines, le pourcentage de RTH observé s'avérait également instable dans le temps (figure 17C).

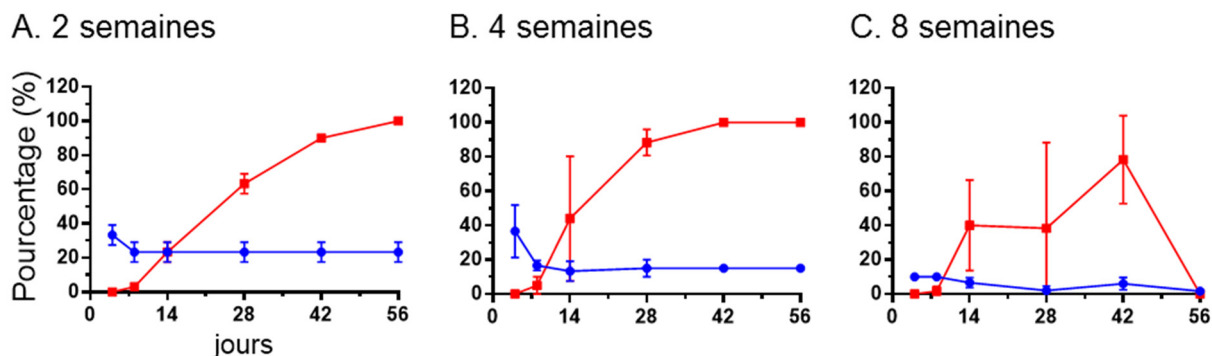


Figure 17 : Pourcentages de viabilité (●) et de RTH (■) observés chez des cultures d'ACN14a en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 dont les inocula étaient âgés de 2 (A), 4 (B) et 8 semaines (C). Les pourcentages de viabilité et de RTH pour les différentes conditions de culture ont été déterminés à l'œil par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules avec le colorant *LIVE/DEAD*®. L'expérience a été réalisée en triplicata et les valeurs présentées correspondent à la moyenne. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type.

2.3.2 Évaluation du potentiel antimicrobien chez *Frankia* spp.

2.3.2.1 Effet du nombre de passages et de la concentration protéique des précultures (Paramètre A)

Préculture sous-cultivée à une concentration protéique approximative (A1)

L'analyse des extraits de surnageant de cultures d'ACN14a a démontré un potentiel antimicrobien soutenu associé à la phase aqueuse envers *E. coli* MC4100 *imp4213*, la souche à Gram négatif hypersensible, lorsque la préculture était repiquée à une concentration protéique approximative. Des diamètres d'inhibition de croissance ont été observés du jour 5 au jour 54 envers cette souche pour les 4 conditions de culture employées. Les zones d'inhibition mesurées présentaient un diamètre allant de 10 à 17 mm en condition BAPS (figure

18A), de 14 à 24 mm en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 (figure 18B), de 12 à 20 mm en condition BAPS KCl 40 mM pH 5,85 (figure 18C) et de 12 à 22 mm en condition BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 (figure 18D). Une zone d'inhibition de croissance de 9 mm de diamètre a également été détectée au jour 12 envers *B. subtilis* ATCC6633, en phase organique, en condition BAPS (figure 18A). L'ensemble des zones d'inhibition de croissance détectées envers *E. coli* MC4100 *imp4213* étaient partielles, le tapis bactérien présent dans ces zones semblait en moyenne de 85 à 95 % moins dense que le reste du tapis sur gélose durant les 8 semaines de suivi (figure 18F, G, H et I). Les zones d'inhibition détectées envers *B. subtilis* ATCC6633 étaient complètes, mis à part la présence de certaines colonies bactériennes par endroit (figure 18E). Par ailleurs, des analyses supplémentaires ont démontré que pour 64 % des extraits en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 et 36 % des extraits en condition BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7, la phase aqueuse présentait une mesure de diamètre d'inhibition de croissance envers *E. coli* MC4100 *imp4213* supérieure d'au moins 1 mm par rapport à celle mesurée pour un même jour de prélèvement dans les trois autres conditions. En condition BAPS et BAPS KCl 40 mM pH 5,85 les zones d'inhibition de croissance mesurées pour chaque jour de prélèvement n'étaient jamais supérieures à celles mesurées pour le même jour dans les trois autres conditions (tableau 1). De surcroît, les plus grands diamètres d'inhibition de croissance associés à la phase aqueuse envers *E. coli* MC4100 *imp4213* ont été observés en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, suivi de près par la condition BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 et par la condition BAPS KCl 40 mM pH 5,85 pour finir avec la condition BAPS. Ces conditions présentaient respectivement un diamètre d'inhibition maximal envers *E. coli* MC4100 *imp4213* de 17, 24, 20 et 22 mm (tableau 1).

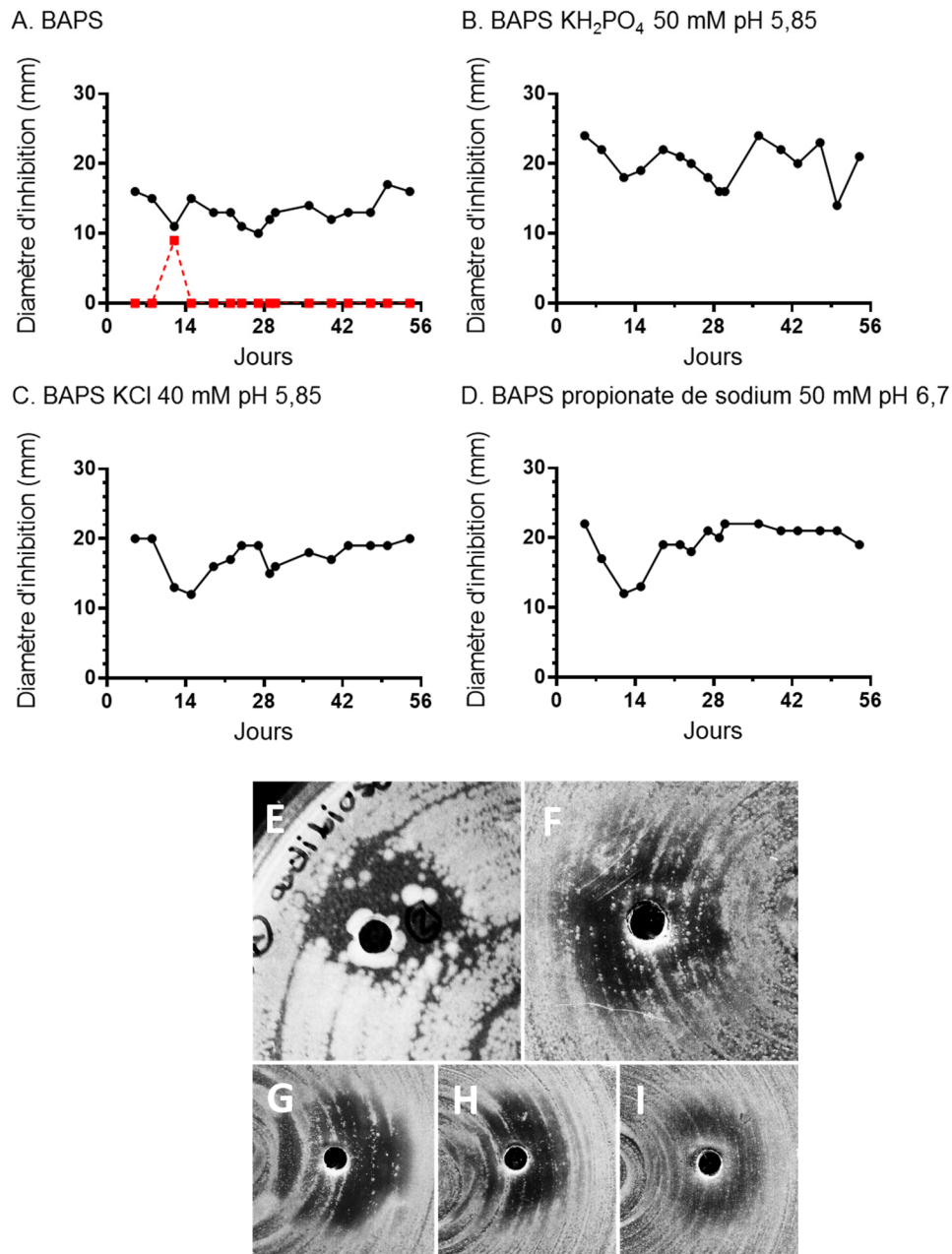


Figure 18 : Mesures des diamètres d'inhibition de croissance (A, B, C et D) et apparence des zones d'inhibition de croissance (E, F, G, H et I) associés aux extraits de surnageant de cultures d'ACN14a dont la préculture avait été repiquée à une concentration protéique approximative. La première portion de la figure représente les diamètres d'inhibition de croissance envers *E. coli* MC4100 *imp4213* (●) et *B. subtilis* ATCC6633 (■) en conditions BAPS, BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85, BAPS KCl 40 mM pH 5,85 et BAPS propionate de

sodium 50 mM pH 5,85. Les lignes pleines correspondent à la phase aqueuse et la ligne hachurée à la phase organique. La deuxième portion de la figure représente l'apparence des zones d'inhibition associées à la phase organique envers *B. subtilis* ATCC6633 en condition BAPS au jour 10 (E) et associées à la phase aqueuse envers *E. coli* MC4100 *imp4213* en condition BAPS au jour 5 (F), BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85 au jour 22 (G), BAPS KCl 40 mM pH 5,85 au jour 40 (H) et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 au jour 15 (I). Les puits mesurent 4 mm de diamètre, la prise de mesures et les numérisations ont été effectuées suite à un essai d'antibiogramme avec les phases aqueuses et organiques concentrées des extraits de surnageant de culture par la technique de diffusion en agar.

Tableau 1 : Comparaison du potentiel antimicrobien des phases aqueuses de surnageant de cultures d'ACN14a dans différentes conditions de culture envers *E. coli* MC4100 *imp4213* lorsque la préculture était repiquée à une concentration protéique approximative.

Milieux	Diamètre d'inhibition maximal (mm) ^a	Inhibition maximale relative (%) ^b
BAPS	17	0
BAPS KH ₂ PO ₄ 50 mM pH 5,85	24	64
BAPS KCl 40 mM pH 5,85	20	0
BAPS propionate de sodium 50 mM pH 5,85	22	36

a : La valeur correspond à la mesure de la plus grande zone d'inhibition détectée entre les jours 0 et 54 de culture d'ACN14a envers *E.coli* MC4100 *imp4213*.

b : La valeur correspond à la fréquence relative à laquelle l'extrait d'un milieu de culture, pour un jour précis, présente un diamètre d'inhibition supérieur d'au moins 1 mm par rapport à celui des extraits provenant des autres milieux de culture pour le même jour.

Préculture passée une fois à 7,5 µg de protéines/ml (A2)

Plusieurs zones d'inhibition de croissance ont été observées à partir d'extraits provenant d'une culture de la souche ACN14a en conditions BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 lorsque la préculture était repiquée une fois à 7,5 µg de protéines/ml. Notamment, en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, des zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique et ciblant *B. subtilis* ATCC6633 étaient détectées du jour 8 au jour 43 lors du deuxième essai d'antibiogramme. Ces zones présentaient un diamètre allant de 5 à 15 mm de diamètre (figure 19A). Lors du premier essai, une zone d'inhibition était seulement perceptible au jour 9 pour la phase organique envers cette souche, les extraits de surnageant semblent donc avoir acquis une certaine toxicité ou potentiel antimicrobien entre le premier et le deuxième essai d'antibiogramme (résultats non montrés). Toutes les zones d'inhibition de croissance détectées étaient complètes et présentaient l'apparence de la zone illustrée à la figure 19C, aucun tapis bactérien n'était présent dans ces zones. Des zones d'inhibition partielles associées à la phase organique et ciblant *E. faecalis* ATCC29212 ont également été observées aux jours 45 et 54 dans cette condition de culture. Les zones d'inhibition détectées présentaient un diamètre de 25 mm (figure 19A et D). Lors du premier essai d'antibiogramme, des zones d'inhibitions associées à la phase aqueuse et ciblant *E. coli* MC4100 *imp4213* ont été observées en condition BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 du jour 25 au jour 54. Ces zones d'apparence très partielle présentaient un diamètre allant de 15 à 17 mm, les colonies semblaient moins denses dans ces zones par rapport au reste du tapis bactérien (figure 19B et E). Lors du deuxième essai d'antibiogramme, aucune zone d'inhibition de croissance n'a été détectée dans cette même condition envers *E. coli* MC4100 *imp4213*, suggérant une perte du potentiel antimicrobien ciblant cette souche suivant le premier essai d'antibiogramme. Des zones d'inhibition partielles associées à la phase aqueuse en condition BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 ont également été observées du jour 10 au jour 31 envers *P. aeruginosa* ATCC 27853, les diamètres d'inhibition de croissance mesurés allaient de 6 à 10 mm (figure 19B et F).

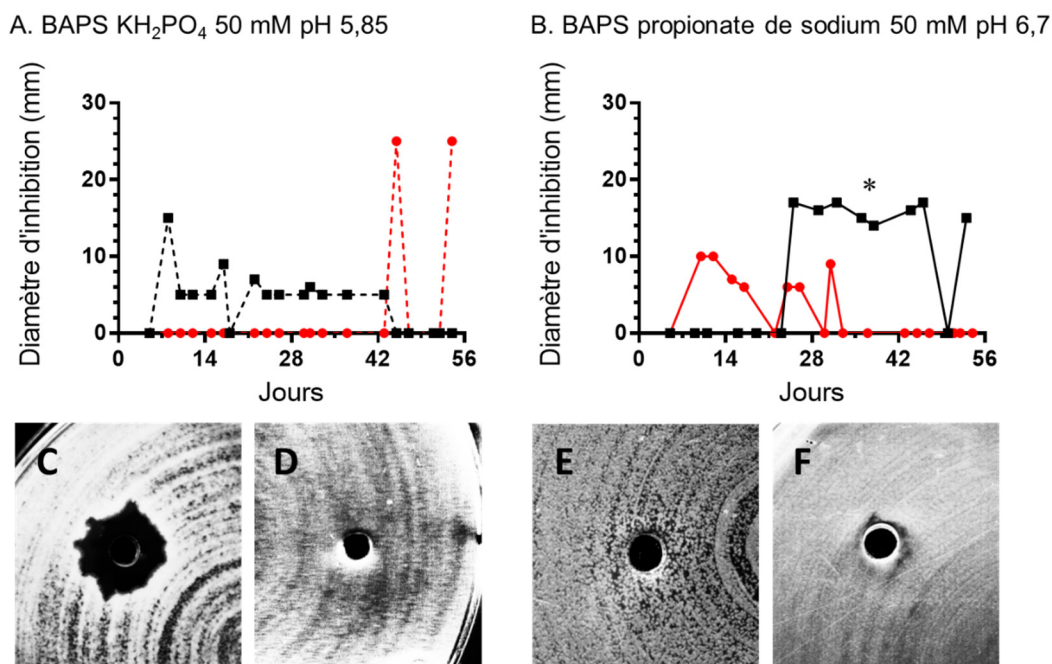
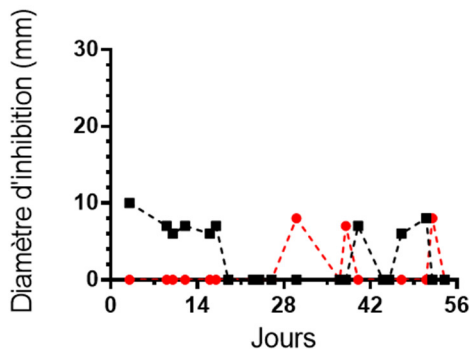


Figure 19 : Mesures des diamètres d'inhibition de croissance (A et B) et apparence des zones d'inhibition de croissance (C, D et E, F) associés aux extraits de surnageant de cultures d'ACN14a dont la préculture avait été repiquée à une fois à une concentration protéique de 7,5 $\mu\text{g/ml}$. Les mesures de diamètres d'inhibition de croissance chez *B. subtilis* ATCC6633 en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 et chez *E. coli* MC4100 *imp4213* en condition BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 sont représentés par un carré noir (■). Les diamètres d'inhibition de croissance chez *E. faecalis* ATCC29212 en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 et les diamètres d'inhibition de croissance chez *P. aeruginosa* ATCC 27853 en condition BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 sont représentés par un cercle rouge (●). Les lignes pleines correspondent à la phase aqueuse et les lignes hachurées à la phase organique. L'apparence des zones d'inhibition de croissance pour chacune des conditions est représentée sous les graphiques correspondants : zones d'inhibition de croissance en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 associées à la phase organique envers *B. subtilis* ATCC6633 au jour 8 (C) et envers *E. faecalis* ATCC29212 au jour 45 (D) et zones d'inhibition de croissance en milieu BAPS propionate de sodium 50 mM pH 5,85 associées à la phase aqueuse envers *E. coli* MC4100 *imp4213* au jour 29 (E) et envers *P. aeruginosa* ATCC 27853 au jour 12 (F). Les données associées à la souche *E. coli* MC4100 *imp4213* (*) sont celles du premier essai d'antibiogramme. Les puits mesurent 4 mm de diamètre, la prise de mesures et les

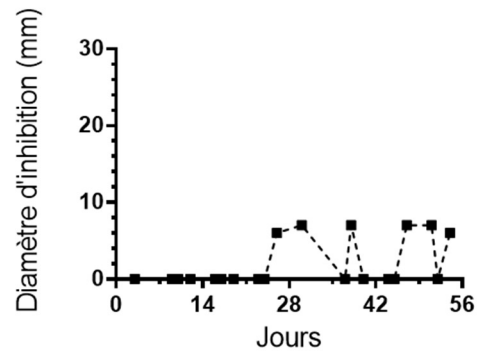
numérisations ont été effectuées suite à un essai d'antibiogramme avec les phases aqueuses et organiques concentrées des extraits de surnageant de culture par la technique de diffusion en agar.

Lorsqu'une préculture d'ACN10a est repiquée une fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml, des zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique étaient observées envers *B. subtilis* ATCC6633 dans les 4 conditions employées. Les essais d'antibiogramme ont révélé la présence de ces zones des jours 3 à 17 et des jours 40 à 51 en condition BAPS, des jours 26 à 54 en condition BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85, des jours 9 à 54 en condition BAPS KCl 40 mM pH 5,85 et des jours 3 à 12 et 24 à 45 en condition BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 (figure 20A, B, C et D). En condition BAPS des zones d'inhibition complètes ont été observées aux jours 3 et 17 (figure 20E). Mis à part les zones d'inhibition de croissance observées aux jours 3 et 17 en condition BAPS, l'ensemble des zones d'inhibition observées envers *B. subtilis* ATCC6633 en conditions BAPS et BAPS KCl 40 mM pH 5,85 étaient d'apparence quasi complète. Une inhibition de plus de 95 % de la croissance bactérienne était observée dans ces zones lorsqu'on comparait avec le reste du tapis sur gélose (figure 20H). Les zones d'inhibition de croissances observées en conditions BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85 et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 étaient plus partielles qu'en conditions BAPS et BAPS KCl 40 mM pH 5,85 (figure 20G et I). En condition BAPS, des zones d'inhibition de croissance partielles envers *P. aeruginosa* ATCC27853 ont également été observées aux jours 30, 38 et 52. Dans ces zones, une inhibition d'environ 80 % de la croissance bactérienne a été observée (figure 20F). Une apparition et une disparition de certaines zones d'inhibition de croissance envers *B. subtilis* ATCC6633 ont également été observées lors du deuxième essai d'antibiogramme, mais les résultats généraux concernant l'activité antibiotique restaient les mêmes (résultats non montrés).

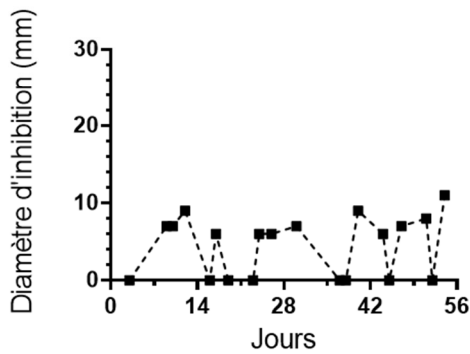
A. BAPS



B. BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85



C. BAPS KCl 40 mM pH 5,85



D. BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7

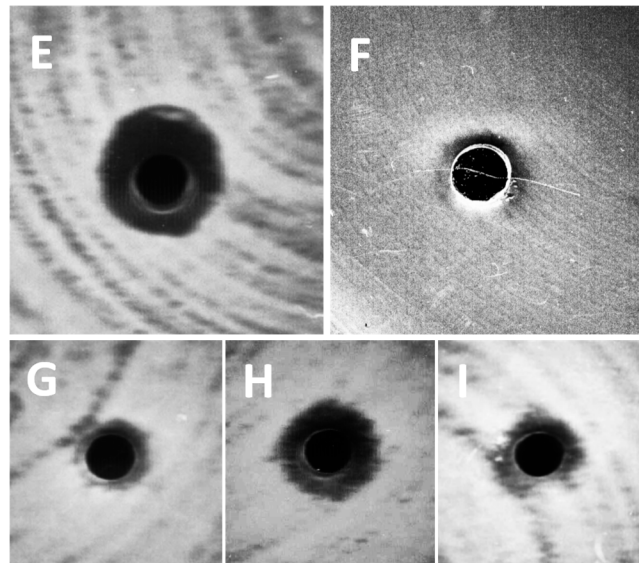
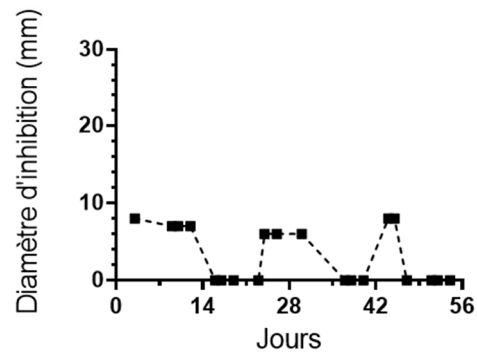


Figure 20 : Mesures des diamètres d'inhibition de croissance (A, B, C et D) et apparence des zones d'inhibition de croissance (E, F, G, H et I) associés à la phase organique des extraits de surnageant de cultures d'ACN10a dont la préculture avait été repiquée une fois à une

concentration protéique de 7,5 µg/ml. La première portion de la figure représente les diamètres d'inhibition de croissance envers *B. subtilis* ATCC6633 (■) et envers *P. aeruginosa* ATCC 27853 (●) en condition BAPS, BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85, BAPS KCl 40 mM pH 5,85 et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 5,85. La deuxième portion de la figure représente l'apparence des zones d'inhibition associées à la phase organique des extraits envers *B. subtilis* ATCC6633 en condition BAPS au jour 3 (E) et envers *P. aeruginosa* ATCC 27853 en condition BAPS au jour 30 (F), puis envers *B. subtilis* ATCC6633 en conditions BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85 au jour 26 (G), BAPS KCl 40 mM pH 5,85 au jour 40 (H) et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 au jour 12 (I). Les puits mesurent 4 mm de diamètre, la prise de mesures et les numérisations ont été effectuées suite à un essai d'antibiogramme avec les phases aqueuses et organiques concentrées des extraits de surnageant de culture par la technique de diffusion en agar. Les graphiques regroupent les résultats du deuxième essai d'antibiogramme.

Préculture passée deux fois à 7,5 µg de protéines/ml (2A)

Lorsqu'une préculture d'ACN14a était passée deux fois à 7,5 µg de protéines/ml, des zones d'inhibition de croissance associées à la phase aqueuse ont été observées envers *E. coli* MC4100 *imp4213*, en condition BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85. Ces zones partielles ont été observées des jours 29 à 53 lors du premier essai, et des jours 33 à 54 lors du deuxième essai (figure 21A). Les zones d'inhibition de croissance détectées lors du deuxième essai présentaient de plus petits diamètres et s'avéraient plus faibles en intensité, lorsqu'on les comparait avec celles observées lors du premier essai (figure 21). Une perte partielle du potentiel antimicrobien semble donc être survenue entre les premier et deuxième essais d'antibiogramme pour ces échantillons. Par ailleurs, deux zones d'inhibition de croissance sont apparues envers *E. coli* MC4100 *imp4213* aux jours 5 et 9 lors du deuxième essai d'antibiogramme (figure 21A). Il est possible qu'une prise de toxicité ou de potentiel antimicrobien soit apparue suite à l'entreposage à long terme ou aux cycles de gel/dégel pour ces échantillons.

Lorsqu'une préculture d'ACN10a était passée deux fois à une concentration de 7,5 µg de protéines/ml, on observait une perte des zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique et ciblant *B. subtilis* ATCC6633. En effet, aucune zone d'inhibition de croissance n'a été détectée envers les souches indicatrices dans les 4 conditions de culture employées (résultats non montrés). Les extraits n'ont donc pas été sélectionnés pour des essais ultérieurs contre des souches d'intérêt clinique.

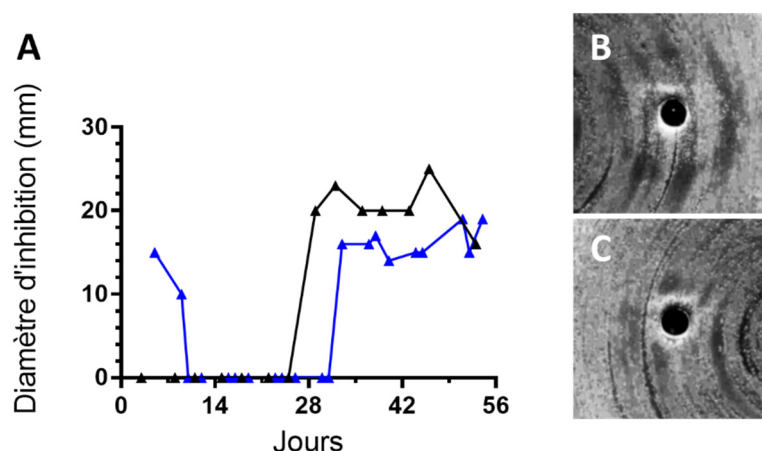


Figure 21 : Mesure des diamètres d'inhibition de croissance (A) et apparence des zones d'inhibition de croissance (B et C) associées à la phase aqueuse des extraits de surnageant de cultures d'ACN14a, lorsque la préculture était repiquée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml. La portion gauche représente les diamètres d'inhibition de croissance mesurés envers *E. coli* MC4100 *imp4213* en condition BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85 lors des premier (▲) et deuxième (▲) essais. La portion droite représente l'apparence des zones d'inhibition de croissance envers *E. coli* MC4100 *imp4213* au jour 43 du premier essai (B) et au jour 44 du deuxième essai (C). Les puits mesurent 4 mm de diamètre, la prise de mesures et les numérisations ont été effectuées suite à des essais d'antibiogramme avec les phases aqueuses et organiques concentrées des extraits de surnageant de culture par la technique de diffusion en agar.

2.3.2.2 Effet d'une absence d'homogénéisation de l'inoculum chez *Frankia alni* ACN14a et *Frankia* sp. ACN10a (Paramètre B)

Lorsque des précultures d'ACN14a et ACN10a étaient passées successivement trois fois sans homogénéisation préalable de l'inoculum, une activité antibiotique associée à la phase organique et ciblant *B. subtilis* ATCC6633 était observée dans chacune des conditions. Cette activité semblait reproductible dans le temps et très similaire chez les deux souches étudiées. D'une part, ce signal antibiotique était observé suivant chacun des repiquages chez les deux souches en question, et ce, dans chacune des conditions de culture (figure 22). D'autre part, l'activité antibiotique détectée chez les cultures d'ACN14a et ACN10a était d'apparence similaire pour une même condition de culture. En effet, le signal antibiotique en condition BAPS s'avérait pratiquement identique chez les deux souches à l'étude durant les 42 jours de suivi. Un premier pic d'activité était observé des jours 4 à 8, suivi d'un second au jour 18 puis d'un troisième au jour 32. Les zones d'inhibition de croissance présentaient également des diamètres similaires d'une souche à l'autre pour un même jour de prélèvement (figure 22A, D et G). Le même phénomène était observé en conditions inductrices. Le signal antibiotique durant les 42 jours de suivi en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 et BAPS KH_2PO_4 25 mM pH 5,85 s'avérait similaire, peu importe la souche de *Frankia* étudiée. Un premier pic d'activité était observé des jours 4 à 18 chez ACN14a en milieu inducteur contenant 50 mM de KH_2PO_4 , et des jours 4 à 14 chez ACN10a en milieux inducteurs contenant 25 et 50 mM de KH_2PO_4 . Un second pic était observé des jours 32 à 38 pour ACN14a dans la même condition et au jour 32 pour ACN10a dans les mêmes milieux inducteurs. Les diamètres d'inhibition présentaient des tailles similaires pour un même jour de prélèvement chez les deux souches (figure 22A, D et G). Une comparaison du signal antibiotique observé en condition BAPS chez deux cultures d'ACN10a a aussi démontré une reproductibilité du signal antimicrobien chez différentes cultures d'une même souche (figure 22D et G). Les zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique des extraits de surnageant de cultures d'ACN14a et ACN10a étaient d'apparence partielle. Ces zones présentaient une apparence similaire, et ce, peu importe les conditions employées (figure 22B, C, E, F, H et I).

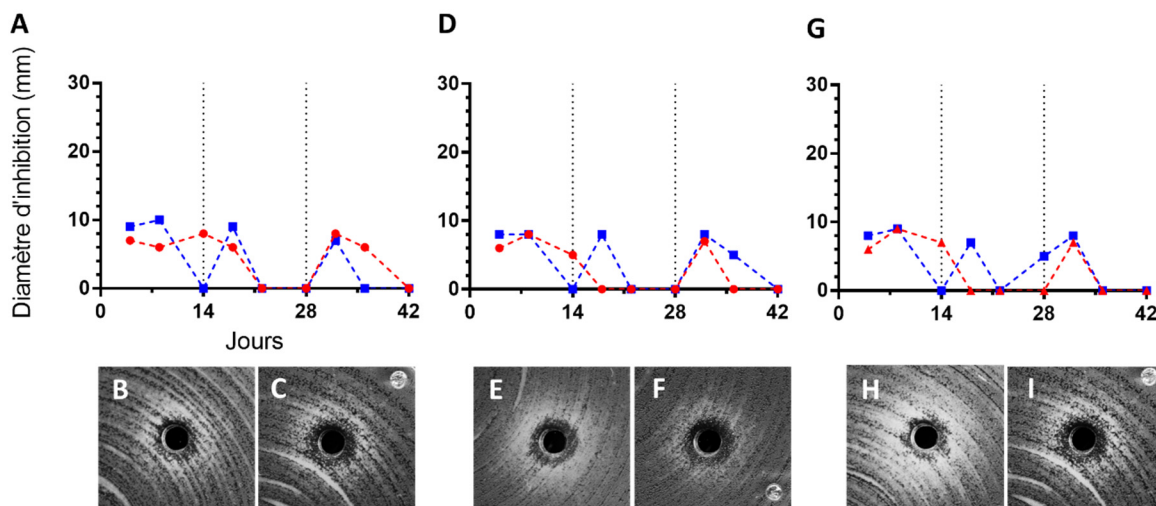


Figure 22 : Mesures des diamètres d'inhibition de croissance (A, D et G) et apparence des zones d'inhibition de croissance (B, C, E, F, H et I) associés à la phase organique des extraits de surnageant de cultures d'ACN14a et d'ACN10a, lorsque la préculture était passée trois fois sans homogénéisation de l'inoculum. La portion du haut représente les diamètres d'inhibition de croissance mesurés envers *B. subtilis* ATCC6633 en conditions BAPS (■), BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85 (●) et BAPS KH₂PO₄ 25 mM pH 5,85 (▲) chez ACN14a (A) et ACN10a (D et G). Le nombre de jours totaux est indiqué en axe des x. Le jour 0 et les jours 14 et 28 (indiqués par une ligne pointillée) représentent les moments auxquels un repiquage sans homogénéisation des précultures a eu lieu. La portion du bas représente l'apparence des zones d'inhibition de croissance envers *B. subtilis* ATCC6633 associées à la phase organique d'extraits de surnageant de cultures d'ACN14a au jour 32 en condition BAPS (B) et au jour 14 en condition BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85 (C), de cultures d'ACN10a au jour 32 en condition BAPS (E) et au jour 8 en condition BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85 (F), au jour 18 en condition BAPS (H) et au jour 8 en condition BAPS KH₂PO₄ 25 mM pH 5,85 (I). Les puits mesurent 4 mm de diamètre, la prise de mesures et les numérisations ont été effectuées suite à des essais d'antibiogramme avec les phases aqueuses et organiques concentrées des extraits de surnageant de culture par la technique de diffusion en agar. Les résultats présentés sont ceux du deuxième essai d'antibiogramme.

2.3.2.3 Effet de la concentration protéique d'une préculture et du degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue chez *Frankia alni* ACN14a (Paramètre C)

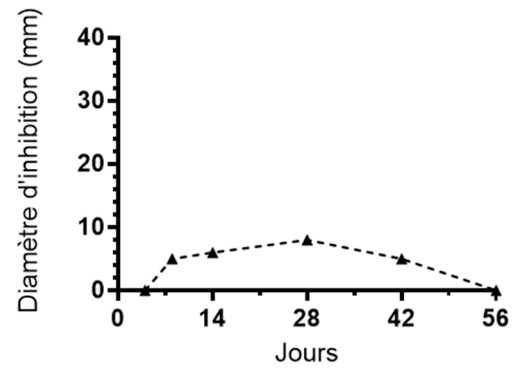
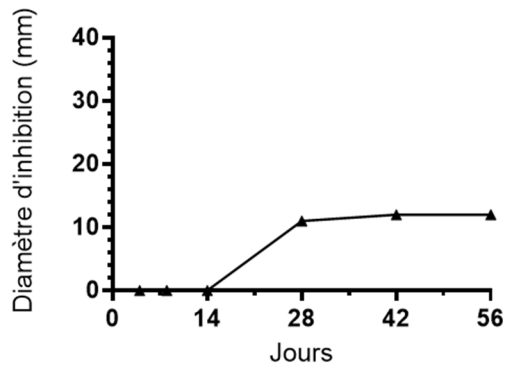
Chez la souche ACN14a, une augmentation de la concentration protéique de la préculture entraînait une augmentation subséquente du potentiel antimicrobien lié à la phase organique. Les zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique et ciblant *B. subtilis* ATCC6633 présentaient un diamètre pouvant aller jusqu'à 30 mm pour une préculture inoculée à 15 µg de protéines/ml. Au contraire, lorsque des précultures étaient inoculées à 7,5 µg de protéines/ml et à une concentration protéique approximative (~ 5 µg de protéines/ml), un diamètre d'inhibition de croissance d'au plus 9 mm et une absence de zones d'inhibition de croissance étaient observés, respectivement. La concentration protéique des précultures influençant l'activité antibiotique de la phase organique, cette dernière semblait peu influencée par le degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue. Par ailleurs, l'activité antibiotique de la phase aqueuse semblait peu influencée par la concentration protéique des précultures et le degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue. Les zones d'inhibition de croissance associées à cette phase et ciblant *B. subtilis* ATCC6633 présentaient un diamètre autour de 10 mm. Il importe de mentionner qu'aucune zone d'inhibition de croissance n'a été détectée envers *E. coli* MC4100 *imp4213* et *E. coli* MC4100 *acrAB* (résultats non montrés).

2.3.2.4 Effet de l'âge de l'inoculum chez *Frankia alni* ACN14a (Paramètre D)

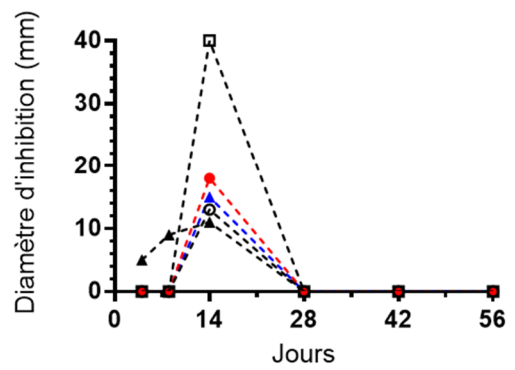
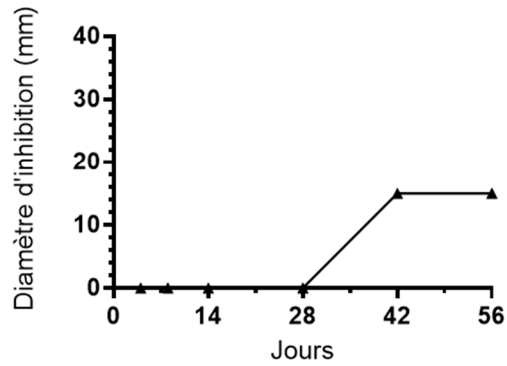
Suivant l'inoculation des cellules en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, le potentiel antimicrobien observé d'un réplica à l'autre semblait suivre la même « courbe type ». Pour chacune des conditions, les signaux antibiotiques observés chez les différents réplicas étaient similaires, mais légèrement décalés dans le temps (résultats non montrés). Une activité antibiotique associée à la phase aqueuse et ciblant *B. subtilis* ATCC6633 était observée pour l'ensemble des conditions, que l'inoculum soit âgé de 2, 4 ou 8 semaines. Les zones d'inhibition

de croissance étaient perceptibles des jours 28 à 56 pour un inoculum âgé de 2 semaines (figure 23A), des jours 42 à 56 pour un inoculum âgé de 4 semaines (figure 23B) et au jour 4 et des jours 14 à 56 pour un inoculum âgé de 8 semaines (figure 23C). Des zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique et ciblant *B. subtilis* ATCC6633 étaient également perceptibles dans les trois conditions testées. Des zones d'inhibition de croissance d'un diamètre allant de 5 à 8 mm étaient perceptibles des jours 8 à 42 pour un inoculum âgé de 2 semaines (figure 23A) et des jours 5 à 28 pour un inoculum âgé de 8 semaines (figure 23C). Pour un inoculum âgé de 4 semaines, les zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique et ciblant *B. subtilis* ATCC6633 étaient observées des jours 5 à 14 seulement, mais présentaient un diamètre allant de 5 à 11 mm (figure 23B). Les zones d'inhibition de croissance associées aux phases aqueuse et organique et ciblant *B. subtilis* ATCC6633 pour des inocula âgés de 2, 4 et 8 semaines étaient d'apparence très similaire (figure 23D). Pour un inoculum âgé de 4 semaines, des zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique ont été observées au jour 14 envers *E. coli* MC4100 *imp4213* (figure 23E), *E. coli* MC4100 *acrAB* (figure 23G), *S. aureus* ATCC29213 (figure 23H) et *E. faecium* ATCC35667 (figure 23I). Les zones d'inhibition de croissance mesurées pour ces souches présentaient respectivement des diamètres de 15, 13, 18 et 40 mm (figure 23B). La zone d'inhibition observée pour *E. faecium* ATCC35667 présentait une apparence très similaire aux zones d'inhibition de croissance observées pour une culture d'ACN14a en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 dont la préculture avait été passée une fois à 7,5 μg de protéines/ml (figure 23I). Lors du premier essai d'antibiogramme, des zones d'inhibition de croissance de taille et d'apparence similaire étaient perçues aux jours 4 et 14 envers *E. coli* MC4100 *imp4213* en phase organique (figure 23F). Lors du deuxième essai d'antibiogramme, la zone d'inhibition précédemment détectée au jour 4 était absente et celle détectée au jour 14 présentait une intensité beaucoup plus faible (figure 23E) lorsque comparée à celle détectée le même jour lors du premier essai (figure 23F).

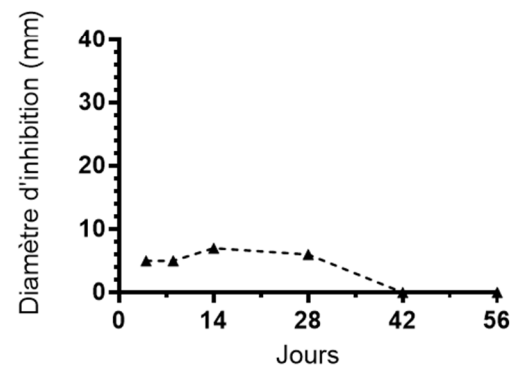
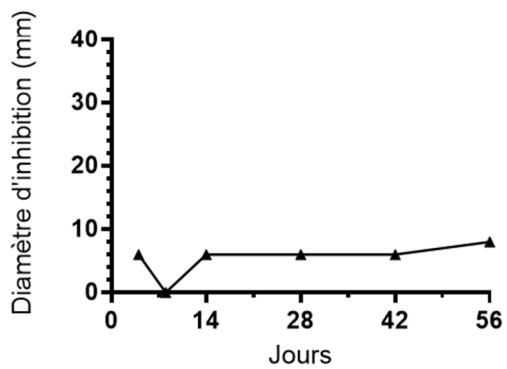
A. 2 semaines



B. 4 semaines



C. 8 semaines



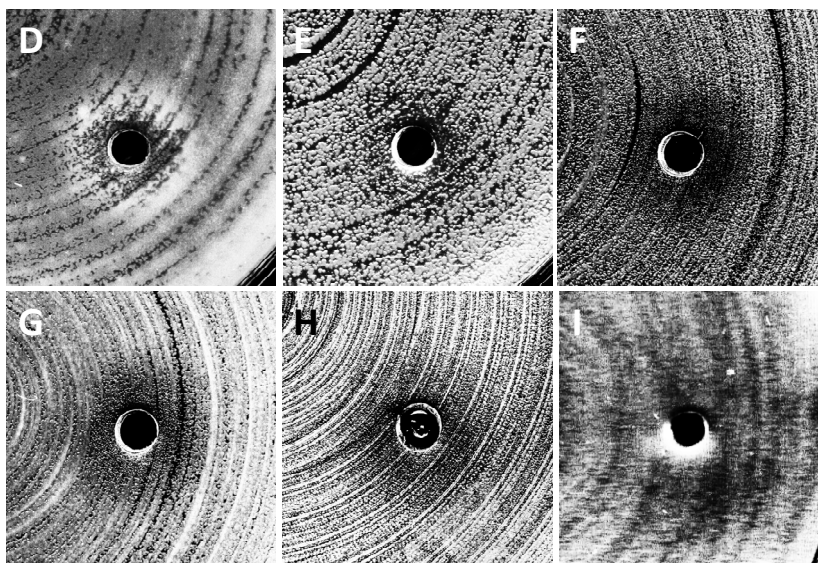


Figure 23 : Mesures des diamètres d'inhibition de croissance (A, B et C) et apparence des zones d'inhibition de croissance (D, E, F, G, H et I) associées aux extraits de surnageant de cultures d'ACN14a en condition BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, lorsque l'inoculum était âgé de 2, 4 et 8 semaines. La première portion de la figure représente les diamètres d'inhibition de croissance envers *B. subtilis* ATCC6633 (▲), *E. coli* MC4100 *imp4213* (▲), *E. coli* MC4100 *acrAB* (○), *E. faecium* ATCC35667 (□) et *S. aureus* ATCC29213 (●). Les lignes pleines correspondent à la phase aqueuse (graphiques de gauche) et les lignes hachurées correspondent à la phase organique (graphiques de droite). Les graphiques présentés représentent des « courbes types » associées à la deuxième série d'essais d'antibiogrammes. Les données associées à la souche *E. coli* MC4100 *acrAB* sont celles du premier essai, cette dernière n'ayant été testée qu'une seule fois pour permettre d'évaluer un plus grand nombre de souches cliniques. La deuxième portion de la figure représente l'apparence des zones d'inhibition de croissance associée aux phases aqueuse et organique envers *B. subtilis* ATCC6633 (photo : phase organique suivant 14 jours d'incubation pour un inoculum âgé de 4 semaines) (D) et apparence des zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique pour un inoculum âgé de 4 semaines suivant 14 jours d'incubation envers *E. coli* MC4100 *imp4213* lors du deuxième essai (E), et du premier essai (F), envers *E. coli* MC4100 *acrAB* lors du premier essai (G), envers *S. aureus* ATCC29213 (H) et *E. faecium* ATCC35667 (I). Les puits mesurent 4 mm de diamètre, la prise de mesures et les numérisations ont été

effectuées suite à un essai d'antibiogramme avec les phases aqueuses et organiques concentrées des extraits de surnageant de culture par la technique de diffusion en agar.

2.3.3 Évaluation du lien entre la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques chez *Frankia* spp.

Chez la souche ACN14a, le potentiel antimicrobien associé à la phase aqueuse semble toujours plus élevé en conditions inductrices, et diminue graduellement suivant une diminution de la capacité des cellules à se différencier (tableau 2 expériences A1, A2, A3 et B). Contrairement à ce qui était observé chez ACN14a, aucun potentiel antimicrobien associé à la phase aqueuse n'a été détecté chez la souche ACN10a, malgré une différenciation moindre ou élevée des cellules (tableau 2 expériences A2, A3 et B). Chez la souche ACN14a, le potentiel antimicrobien associé à la phase organique ne diminue pas de pair avec une diminution de la capacité des cellules à se différencier (tableau 2 expériences A1, A2, A3 et B). Une faible activité antibiotique a également été détectée pour cette phase en absence de différenciation cellulaire alors qu'une absence d'activité antibiotique a été constatée en présence d'hyphes toruleux (tableau 2 expérience A1). De même, une absence de différenciation cellulaire et une activité antibiotique moyennement élevée ont été constatées lorsque les cultures étaient passées sans homogénéisation de l'inoculum (tableau 2 expérience B). Chez la souche ACN10a, tout comme chez ACN14a, il arrive que l'activité antibiotique associée à la phase organique soit plus élevée en absence de différenciation cellulaire qu'en présence d'hyphes toruleux (tableau 2 expérience A2). Il arrive également que cette activité antibiotique soit complètement nulle ou moyennement élevée, que les hyphes soient différenciés ou non (tableau 2 expériences A3 et B).

Tableau 2 : Évaluation du lien entre la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques chez *Frankia* spp.

Souches	Expériences	Phase aqueuse		Phase organique	
		BAPS	Milieux inducteurs	BAPS	Milieux inducteurs
ACN14a	A1	+++	++++	+	-
	A2	-	++	-	++
	A3	-	+	-	-
	B	-	-	++	++
	C		+		+
	D		++		++++
ACN10a	A1				
	A2	-	-	++++	+++
	A3	-	-	-	-
	B	-	-	++	++
	C				
	D				

Les couleurs indiquent le degré de différenciation et les signaux +/- indiquent l'intensité de la réponse antibiotique. La mesure d'intensité du potentiel antimicrobien a été évaluée en se basant sur les critères suivant : diversité de souches cibles, fréquence d'inhibition de croissance, diamètre et intensité des zones d'inhibition de croissance. La mesure d'intensité de différenciation des cellules a été évaluée en microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules au *LIVE/DEAD*®. Préculture sous-cultivée à une concentration protéique approximative (A1), préculture passée une fois à 7,5 µg de protéines/ml (A2), préculture passée deux fois à 7,5 µg de protéines/ml (A3), effet d'une absence d'homogénéisation de l'inoculum (B), effet de la concentration protéique d'une préculture et du degré d'homogénéisation (C), effet de l'âge de l'inoculum (D), absence d'activité antibiotique (-), activité antibiotique faible (+), activité antibiotique moyennement élevée (++), activité antibiotique élevée (+++), activité antibiotique très élevée (++++), hyphes massivement différenciés (■), hyphes majoritairement différenciés (■), hyphes moyennement différenciés (■), hyphes peu différenciés (■), hyphes non différenciés (■), aucune donnée disponible (■).

CHAPITRE 3

OPTIMISATION DES MÉTHODES D'INDUCTION DE LA DIFFÉRENCIATION CHEZ *FRANKIA ALNI* ACN14A À L'ÉCHELLE DE BIORÉACTEUR

3.1 Mise en contexte

Afin de permettre une étude plus approfondie du métabolisme secondaire chez la souche ACN14a, l'obtention d'hyphes toruleux et d'antibiotiques à grande échelle s'avère primordiale. Parallèlement, l'utilisation de tels appareils permettrait également de mieux contrôler et uniformiser les conditions de culture en cours d'induction. L'ensemble du chapitre 3 se consacre donc à optimiser la différenciation cellulaire chez ACN14a à l'échelle de bioréacteur de 2,2 l. Tel que discuté dans le chapitre 2, l'absence d'homogénéisation d'un inoculum d'ACN14a entraînait une incapacité des hyphes à se différencier. Un criblage en plaques 96 puits avait donc été effectué afin d'évaluer si de plus fortes concentrations d'agents inducteurs permettraient la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH chez des cultures d'ACN14a non homogénéisées. Curieusement, la plaque 96 puits visant à cribler l'effet du KH_2PO_4 avait démontré un effet de bordure. Alors que la biomasse présente dans les puits situés au pourtour de la plaque présentait un métabolisme généralement ralenti et une différenciation cellulaire massive sur un large intervalle de concentrations testées, la biomasse présente dans les puits situés au centre de la plaque présentait un métabolisme généralement actif et une différenciation massive pour une seule des concentrations testées. Il semblait possible que la présence accrue de CO_2 puisse stimuler la croissance, et donc le métabolisme primaire chez la souche ACN14a. Par extension, il pourrait donc s'avérer plus difficile d'induire la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH en présence de CO_2 chez cette souche. Deux fermentations ont alors été effectuées afin d'évaluer l'effet, sur la différenciation RTH et la production d'antibiotiques, d'une diminution graduelle de l'apport en CO_2 au moment d'induire (1), et d'une limitation de l'apport en CO_2 dès le début d'une fermentation (2). Des observations microscopiques et des dosages protéiques effectués 5 jours par semaine ont

permis d'effectuer diverses interventions selon les observations effectuées, dans le but d'optimiser davantage l'obtention d'hyphes toruleux en bioréacteurs.

3.2 Matériel et méthodes

La souche bactérienne employée, ACN14a, est la même qu'au chapitre 2 et le maintien des cultures a été réalisé tel que décrit dans ce précédent chapitre. La préparation des inocula a été effectuée tel que décrit au chapitre 2, mais sans homogénéisation préalable de l'inoculum pour la méthode de criblage en plaque 96 puits, et les observations microscopiques ont été effectuées tel que décrit dans ce précédant chapitre également.

3.2.1 Méthode de criblage en plaque 96 puits

Afin de déterminer les concentrations d'agents inducteurs permettant une différenciation cellulaire vers le morphotype RTH chez des cultures non homogénéisées d'ACN14a, trois plaques 96 puits ont été préparées. Des solutions de différentes concentrations d'agents inducteurs d'un pH final de 6,7 ont été préparées dans le l'eau distillée. Pour la plaque ayant servi à cribler l'effet du KH_2PO_4 , des solutions de KH_2PO_4 initialement concentrées 4x à des concentrations de 40, 200, 240, 280, 320, 360, 400, 500, 600, 800, 1000 et 1200 mM ont été préparées pour une concentration finale en microplaque de 10, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 200, 250 et 300 mM. Pour la plaque ayant servi à cribler l'effet du propionate de sodium, des solutions de propionate de sodium initialement concentrées 4x à des concentrations de 20, 200, 240, 280, 320, 360, 400, 500, 600, 800, 1000 et 1200 mM ont été préparées pour une concentration finale en microplaque de 5, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 200, 250 et 300 mM. Pour la plaque ayant servi à cribler l'effet du KCl, des solutions de KCl initialement concentrées 4x à des concentrations de 0, 160, 240, 280, 320, 360, 400, 500, 600, 800, 1000 et 1200 mM ont été préparées pour une concentration finale en microplaque de 0, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 200, 250 et 300 mM. Les plaques ont été préparées telles que décrites

par Bélanger *et al.* (2011). Brièvement, 100 µl de milieu BAPS 2x ont été déposés dans tous les puits des trois microplaques, puis 50 µl de chacune des solutions inductrices ont été déposées dans une colonne. Des cultures d'ACN14a ont été repiquées deux fois, sans homogénéisation préalable de l'inoculum, puis 50 µl d'inoculum concentré à 60 µg/ml de protéine (pour une concentration finale de 15 µg/ml) ont été ajoutés aux puits, pour un volume final en microplaque de 200 µl. Les microplaques ont été scellées avec du parafilm et incubées deux semaines à l'obscurité et à température ambiante dans un bac de plastique hermétique. Un b cher contenant de l'eau distillée stérile a été placé dans ce bac pour limiter l'évaporation durant l'incubation. Des observations microscopiques à l'aide du colorant *LIVE/DEAD*® et une révélation des plaques à l'aide du réactif MTS ont été effectuées suivant les deux semaines d'incubation, telle que décrit par Bélanger *et al.* (2011).

3.2.2  valuation de la respiration cellulaire par l'addition du réactif MTS/PMS

Brièvement, 15 µl du réactif MTS/PMS ont été ajoutés dans chacun des puits des microplaques, puis ces dernières ont été incubées pour une période de 4 h, à 30  C, à l'obscurité (Bélanger *et al.*, 2011). L'activité métabolique a été jugée selon l'intensité de la coloration des puits, plus la coloration dans les puits tendait vers le rouge plus le métabolisme était actif.

3.2.3 Mise en culture de *Frankia alni* ACN14a   l'échelle de bioréacteur 2,2 l

Les bioréacteurs 2,2 l (*BioFlo 115*, New Brunswick Scientific Co., Inc, Allemagne) ont été assemblés selon les directives du fournisseur. Un triport supplémentaire relié à une bouteille d'ajout a été ajouté.   l'intérieur des cuves, deux tubes 50 ml ont été suspendus à ce triport supplémentaire. Par la suite, 1,5 l de milieu BAPS a été ajouté dans les cuves, puis les bioréacteurs ont été stérilisés à l'autoclave et ensemencés à 20 µg de protéines/ml. Une solution de H₃PO₄ 1M dans une bouteille d'ajout a été utilisée pour maintenir ou ajuster le pH

en cours de fermentation. Du NaOH 2N a également été ajouté dans la bouteille d'ajout reliée au deuxième triport, suivant la stérilisation. Les paramètres de culture de départ pour les fermentations 1 et 2 sont décrits au tableau 3.

Tableau 3 : Paramètres employés pour la croissance d'ACN14a en bioréacteur 2,2 l.

Paramètres	Bioréacteur 1	Bioréacteur 2
Température (°C)	30	30
Agitation (RPM)	150	150
Unité de pH	6.7	6.7
Oxygène dissous (%)	80	80
Flux d'oxygénation (l/min)	0.5	0.5
Air entrant	comprimé et O ₂	O ₂ et N ₂

Le mélange d'air entrant dans le premier bioréacteur était constitué d'air comprimé et d'oxygène, ainsi le mélange d'air injecté était composé de 0,03 % de CO₂, de 79,02 % de N₂ et de 20,95 % de O₂. À l'opposé, le mélange d'air entrant dans le deuxième bioréacteur était constitué d'azote et d'oxygène seulement pour limiter l'apport en CO₂ dans cette cuve avant l'induction. Le mélange d'air entrant dans le fermenteur 2 était donc composé de 79 % de N₂ et de 21 % de O₂.

3.2.4 Suivi des cultures et induction de la différenciation cellulaire RTH

Des prélèvements stériles ont été effectués à l'aide d'un module de prélèvement développé au laboratoire. Des observations microscopiques de la biomasse ont été effectuées à l'aide du colorant *LIVE/DEAD®*, selon la méthode décrite au chapitre 2. Pour chaque prélèvement, 20 ml de culture ont été centrifugés à 3440 x g pendant 10 minutes à 4 °C, puis le surnageant a été filtré à l'aide d'une seringue munie d'un filtre 0,22 µm et entreposé à -80 °C. Le culot de cellules a ensuite été suspendu dans 45 ml de saline 0,85 %, puis centrifugé de nouveau. Le

culot résultant a été suspendu dans 10 ml de saline 0,85 % et les protéines ont été dosées tel que décrit dans le chapitre 2. Les extraits de surnageant ont ensuite été concentrés et leur activité antimicrobienne évaluée via un essai d'antibiogramme selon les méthodes décrites dans la section « matériel et méthodes » du chapitre 2. L'activité des extraits de surnageant des fermentations 1 et 2 a été évaluée envers les trois souches indicatrices. L'activité antibiotique des extraits provenant du fermenteur 1 a également été évaluée envers la banque de bactéries à Gram positif décrite dans la section « matériel et méthodes » du chapitre 2, et la levure *C. albicans* ATCC10231.

L'induction de la différenciation cellulaire a eu lieu à une concentration protéique de 55,43 µg de protéines/ml en cuve 1 et de 51,48 µg de protéines/ml en cuve 2. Suivant les observations quotidiennes des cuves, des interventions supplémentaires ont été effectuées sur chacun des bioréacteurs dans le but d'optimiser la différenciation des cellules vers le morphotype toruleux. L'ensemble des interventions pratiquées sur les bioréacteurs 1 et 2 est répertorié aux tableaux 4 et 5, respectivement. Lorsque le pourcentage de CO₂ injecté augmentait, le pourcentage de N₂ entrant diminuait, et vice-versa. Les ajouts ont été effectués à l'aide des pompes d'ajout situées sur la tour de contrôle des bioréacteurs. Via un système de tubulure, 30 ml de NaOH 2 N ont été ajoutés dans les tubes 50 ml suspendus à l'intérieur de la cuve pour un volume final de 60 ml. Le volume de NaOH 2 N contenu dans les tubes a été remplacé tous les trois jours par une même solution fraîche. Ce NaOH a servi de trappe à CO₂ afin d'aider à éliminer le CO₂ présent dans l'espace de tête du bioréacteur. Le milieu BAPS sodium propionate pH 6,7 d'une concentration finale en bioréacteur de 50 mM a été ajouté via une troisième bouteille d'ajout reliée au triport principal.

Tableau 4 : Ensemble des interventions pratiquées sur le bioréacteur 1.

Jours	Interventions
6	Diminution de la concentration de CO ₂ de l'air entrant à 0,0150 % Ajout de 60 ml de NaOH 2N
9	Diminution de la concentration de CO ₂ de l'air entrant à 0,0075 %
13	Ajout de milieu BAPS propionate de sodium pH 6,7 pour une concentration finale de 50 mM
16	Diminution de la concentration de CO ₂ de l'air entrant à 0,0000 %
20	Acidification du pH à 6,0

Tableau 5 : Ensemble des interventions pratiquées sur le bioréacteur 2.

Jours	Interventions
6	Augmentation de la concentration de CO ₂ de l'air entrant à 0,0075 %
9	Augmentation de la concentration de CO ₂ de l'air entrant à 0,0150 %
14	Ajout de milieu BAPS propionate de sodium pH 6,7 pour une concentration finale de 50 mM Ajout de 60 ml de NaOH 2N
16	Diminution de la concentration de CO ₂ de l'air entrant à 0,0000 %

3.3 Résultats

3.3.1 Criblage de fortes concentrations d'agents inducteurs

Aucune différenciation cellulaire vers le morphotype RTH n'était observée chez la souche ACN14a en condition BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85, lorsque l'inoculum était non homogénéisé. Il est possible que l'affaiblissement des parois cellulaires via l'homogénéisation d'un inoculum soit indispensable à l'efficacité du choc osmotique en condition inductrice,

aucune différenciation n'étant observée en absence du traitement. Un criblage de concentrations supérieures d'agents inducteurs a donc été effectué en plaques 96 puits, dans le but d'induire la différenciation cellulaire vers l'hyphe toruleux chez des cultures non homogénéisées d'ACN14a.

Aucune différenciation cellulaire vers le morphotype RTH n'a été observée chez la souche ACN14a aux concentrations de KCl et de propionate de sodium employées (résultats non montrés). À l'opposé, une différenciation cellulaire massive vers le morphotype RTH a été observée en présence de KH_2PO_4 chez cette souche. En présence de 70, 80, 90, 100 et 125 mM de KH_2PO_4 , l'ensemble des hyphes arboraient la morphologie RTH en périphérie de la plaque (figure 24A). À l'opposé, une différenciation cellulaire massive n'était seulement qu'observée à une concentration de 60 mM de KH_2PO_4 au centre de la plaque (figure 24B). Le résultat MTS présentait également un phénomène particulier, les cellules situées au centre de la plaque présentaient un métabolisme actif alors que les cellules situées au pourtour de la plaque présentaient un métabolisme plutôt ralenti (figure 24C).

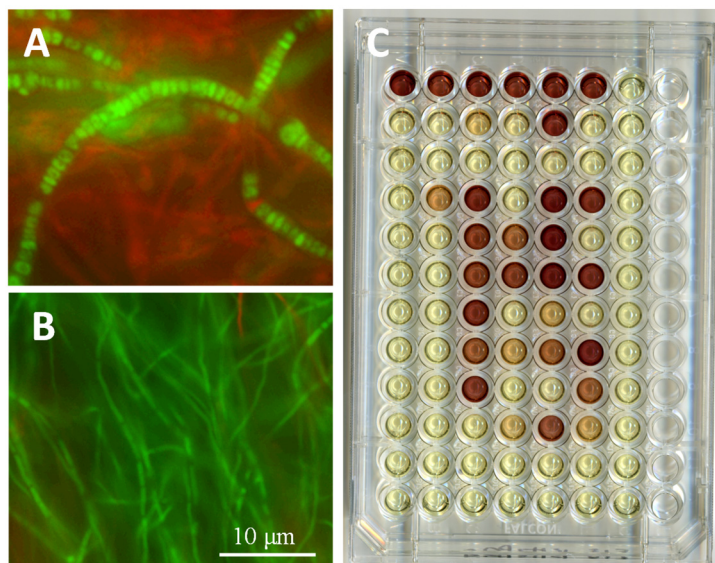


Figure 24 : Apparence des hyphes de cultures d'ACN14a non homogénéisées en bordure (A) et au centre (B) de la plaque 96 puits en présence de 70 mM de KH_2PO_4 , et effet de bordure observé suivant la révélation de la plaque à l'aide du réactif MTS (C). La plaque 96 puits présentait un gradient allant de 10 à 300 mM de KH_2PO_4 . Les observations microscopiques ont été réalisées par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules au *LIVE/DEAD*®.

3.3.2 Induction de la différenciation cellulaire via une élimination progressive du CO_2 (fermentation 1)

Chez la souche ACN14a le CO_2 semble stimuler la croissance cellulaire, et donc le métabolisme primaire plutôt que secondaire. La présence du CO_2 pourrait donc possiblement nuire aux événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques. Le but de cette fermentation était donc de tenter d'induire une différenciation cellulaire vers l'hyphe toruleux via une diminution progressive de la concentration en CO_2 dans la cuve au moment d'induire. Des observations microscopiques et des dosages protéiques ayant été effectués chaque jour, des interventions supplémentaires ont été effectuées dans le but d'optimiser l'obtention d'hyphes toruleux. L'activité antibiotique des extraits de surnageant a également été

testée dans le but d'évaluer l'effet des différentes interventions sur le métabolisme d'une culture d'ACN14a en bioréacteur.

Chez cette souche, une diminution de l'apport en CO₂ promouvait la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH. Pour commencer, une réduction de l'apport en CO₂ de moitié (relativement à la tension atmosphérique) et l'ajout de NaOH au jour 6 n'affectait pas la prolifération cellulaire (tableau 5, figure 25). À la vue de ces résultats, la concentration de CO₂ a de nouveau été diminuée de moitié au jour 9 pour limiter la prolifération des cellules (tableau 5). Cette intervention a entraîné un ralentissement de la prolifération cellulaire et déclenché une légère différenciation cellulaire, puisqu'environ 5 % d'hyphes toruleux étaient observés au jour 10 et l'ensemble des hyphes étaient élargis et arboraient des portions sans matériel génétique (figure 26A). Contre toute attente, les hyphes semblaient s'être adaptés au stress au jour 13, ils présentaient tous l'apparence d'hyphes végétatifs ; aucun RTH n'était visible, les hyphes n'étaient plus élargis et le matériel génétique y était uniformément distribué (figure 26B). Pour tenter de provoquer à nouveau la différenciation des hyphes, du milieu BAPS pH 6,7 avec une concentration finale de 50 mM de propionate de sodium en bioréacteur avait été ajouté (tableau 5). La viabilité des cellules n'a pas été affectée par cette intervention, toutefois une différenciation cellulaire était observée, le pourcentage d'hyphes toruleux atteignant les 10 % au jour 14 (figures 25 et 26C). Par la suite, la présence de très peu d'hyphes toruleux et une reprise de croissance ont été constatées au jour 16, résultant possiblement d'une utilisation du propionate de sodium comme source de carbone (figures 25 et 26D). Suivant ces observations, l'apport en CO₂ entrant a été coupé (0 %) pour tenter d'aider au processus de différenciation (tableau 5). Un arrêt d'apport en CO₂ semble avoir stimulé la différenciation cellulaire chez la souche ACN14a. 20 % des hyphes arboraient la forme RTH au jour 20, et l'ensemble des hyphes étaient septés et présentaient une ségrégation du matériel génétique (figures 25 et 26E). Une acidification subséquente de la cuve au jour 20 n'avait toutefois pas aidé au processus de différenciation des hyphes (figure 25). Pour terminer, une zone d'inhibition de croissance partielle d'un diamètre de 8 mm a été observée envers *B. subtilis* ATCC6633 simultanément à une baisse de viabilité cellulaire au jour 10, suivant une diminution de pourcentage de CO₂ entrant (figure 25).

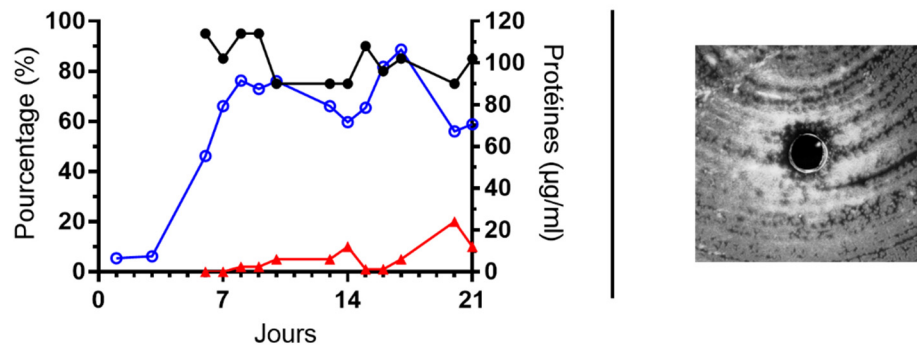


Figure 25 : Suivi du bioréacteur 1 en cours de fermentation. La portion de gauche représente les valeurs de pourcentages de viabilité (●) et de RTH (▲) et la concentration protéique (○) durant les 21 jours de suivi en bioréacteur. La portion de droite représente l'apparence de la zone d'inhibition de croissance mesurée au jour 10 envers *B. subtilis* ATCC6633. Les pourcentages ont été déterminés à l'œil par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules avec le colorant *LIVE/DEAD*® et la concentration protéique a été déterminée par la méthode de Bradford suivant une révélation à 595 nm. Le puits mesure 4 mm de diamètre, la prise de mesure et la numérisation ont été effectuées suite à un essai d'antibiogramme avec les phases aqueuses et organiques concentrées des extraits de surnageant de culture par la technique de diffusion en agar.

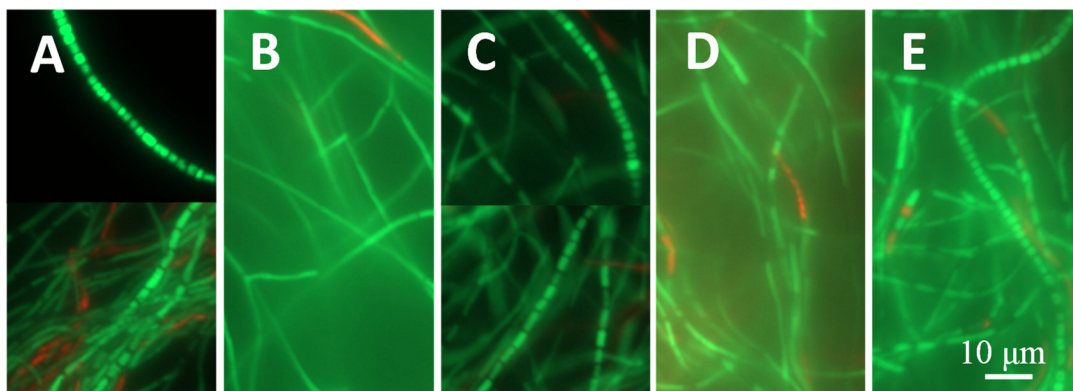


Figure 26 : Apparence des hyphes d'ACN14a aux jours 10 (A), 13 (B), 14 (C), 16 (D) et 20 (E) en cours de fermentation 1. Les observations ont été réalisées par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules au *LIVE/DEAD*®.

3.3.3 Induction de la différenciation RTH via une limitation de l'apport initial en CO₂ (fermentation 2)

Tel que mentionné plus tôt, le CO₂ semble stimuler le métabolisme primaire plutôt que secondaire chez la souche ACN14a. Le but de cette fermentation s'avérait donc d'induire une différenciation cellulaire vers le morphotype RTH en limitant l'apport en CO₂ dans la cuve avant même d'induire plutôt qu'au moment d'induire. Des observations microscopiques et des dosages protéiques ayant été effectués chaque jour, des interventions supplémentaires ont été effectuées dans le but d'optimiser l'obtention d'hyphes toruleux. L'activité antibiotique des extraits de surnageant a également été testée dans le but d'évaluer l'effet des différentes interventions sur le métabolisme d'une culture d'ACN14a en bioréacteur.

Tout d'abord, l'apport en CO₂ s'avère essentiel à la croissance cellulaire chez la souche en question, puisqu'aucune prolifération cellulaire n'a eu lieu en absence de CO₂ des jours 0 à 6 (figure 27). Au jour 6, la biomasse était également beaucoup moins viable que normalement observé en bioréacteur suivant 6 jours de croissance (figure 28A). Une reprise de croissance avait donc été enclenchée au jour 6 par l'entremise d'un apport en CO₂, le mélange de gaz entrant présentant alors le quart du CO₂ normalement retrouvé dans l'air ambiant (tableau 6). L'apport en CO₂ ne semblait toutefois pas suffisant, puisqu'aucune prolifération cellulaire n'a été constatée des jours 6 à 9 (figures 27 et 28A). L'apport en CO₂ a donc été doublé au jour 9 de façon à fournir la moitié du CO₂ normalement contenu dans l'air ambiant (tableau 6). La prolifération cellulaire avait augmenté drastiquement suivant cette intervention, le pourcentage de viabilité passant de 30 à 60 % et la concentration protéique de 4,00 à 51,50 µg/ml, des jours 9 à 14 (figures 27 et 28B). Une nouvelle tentative d'induction a donc été pratiquée sur cette cuve via l'ajout de milieu BAPS pH 6,7 pour une concentration finale de 50 mM de propionate de sodium en bioréacteur, et par l'ajout de 60 ml de NaOH (tableau 6). La biomasse continuait de proliférer au jour 16 suivant l'ajout de propionate de sodium et peu d'hyphes toruleux étaient observés (figure 27 et 28C). Suivant ces observations, l'apport en CO₂ a été coupé (0 %) dans le but d'aider au processus de différenciation (tableau 6). Le jour suivant, les observations microscopiques et le dosage protéique ont démontré un ralentissement de la croissance et une

diminution du pourcentage de viabilité cellulaire. L'arrêt d'apport en CO₂ a également entraîné un élargissement des hyphes et une ségrégation de leur matériel génétique, en plus d'une différenciation cellulaire vers le morphotype RTH chez 20 % des hyphes (figures 27 et 28D). Pour terminer, les extraits de surnageant n'ont démontré aucune activité antibiotique (résultats non montrés).

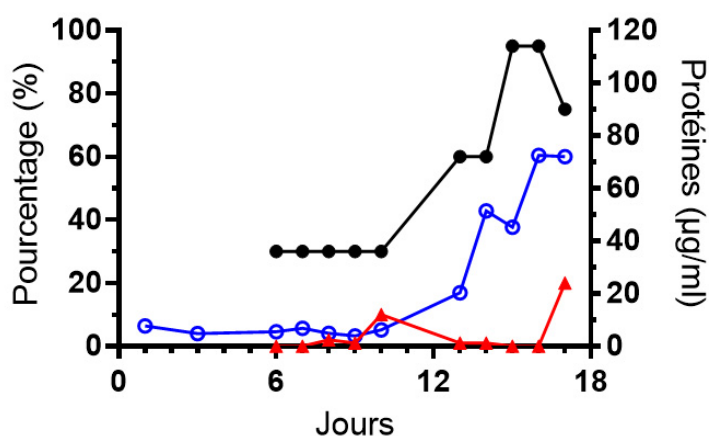


Figure 27 : Suivi du bioréacteur 2 en cours de fermentation. Les valeurs de pourcentages de viabilité (●) et de RTH (▲) et la concentration protéique (○) sont représentées pour les 17 jours de suivi en bioréacteur. Les pourcentages ont été déterminés à l'œil par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules avec le colorant *LIVE/DEAD*®. La concentration protéique a été obtenue par la méthode de Bradford suite à une révélation à 595 nm.

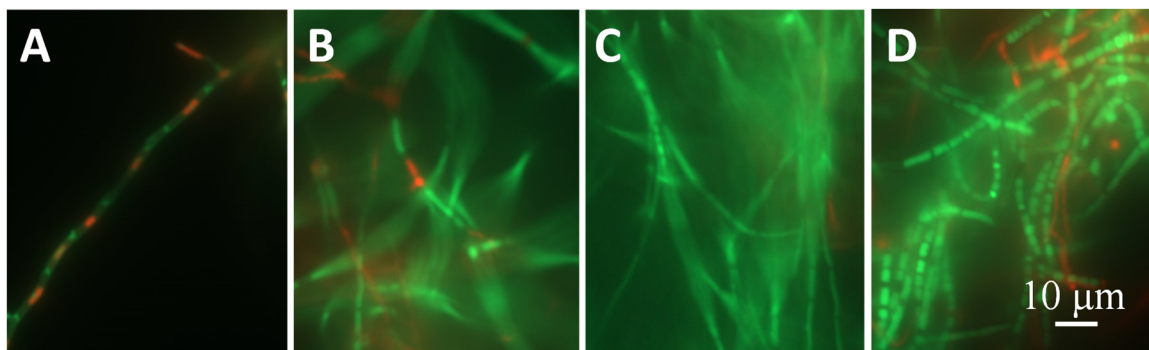


Figure 28 : Apparence des hyphes d'ACN14a aux jours 6 et 9 (A), 14 (B), 16 (C) et 17 (D) en cours de fermentation 2. Les observations ont été réalisées par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules au *LIVE/DEAD*®.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Optimisation de la méthode d'induction de la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH chez *Frankia* sp.

Les travaux de Gagnon (2015) ont récemment démontré que l'état physiologique d'un inoculum influençait grandement la capacité subséquente des hyphes à se différencier en conditions inductrices. Par ailleurs, Shipton et Burggraaf (1983) ont suggéré que plusieurs paramètres intervenant dans le maintien des cultures et la préparation de l'inoculum, pourraient potentiellement influencer l'état physiologique des cultures chez le genre *Frankia*. L'état physiologique des cultures pourrait être influencé, entre autres, par des facteurs tels que la concentration protéique (El-Enshasy *et al.*, 2000; Gagnon, 2015), l'âge des cultures (Saffroy, 2006; Shipton et Burggraaf, 1983), ainsi que leur degré d'homogénéisation (Ibrahim *et al.*, 2015). Différents paramètres influençant l'état physiologique d'un inoculum ont alors été étudiés dans le but d'en évaluer leur effet sur la différenciation cellulaire chez les souches ACN14a et ACN10a. Les paramètres investigués étaient : le nombre de passages et la densité d'inoculation des précultures, le degré d'homogénéisation d'un inoculum à la seringue et l'âge d'un inoculum.

Pour commencer, lorsqu'une préculture d'ACN14a était passée une fois à une concentration protéique approximative, qui, à cette époque, tournait autour de 15 à 20 µg de protéines/ml, une différenciation cellulaire massive et stable vers le morphotype RTH était observée (figures 9 et 10). Au contraire, lorsque la préculture était passée une fois à une concentration protéique inférieure, soit de 7,5 µg/ml, une différenciation massive était observée, mais cette dernière diminuait graduellement en condition BAPS KCl 40 mM pH 5,85, passant de 95 % à 0 % de RTH des jours 22 à 54 (figure 11 et 12A-C). Finalement, lorsque les précultures étaient passées successivement deux fois à une concentration de 7,5 µg de protéines/ml, le

pourcentage de RTH observé devenait instable durant les 8 semaines de suivi (figures 14 et 15A-C, annexe 1). Chez la souche ACN14a, un nombre inférieur de passage à une densité cellulaire supérieure semble donc favoriser une différenciation cellulaire optimale vers le morphotype RTH. Tel que décrit plus tôt, des observations microscopiques des précultures ont été effectuées la veille de chacune des expériences. Ces observations ont démontré que le pourcentage de viabilité de précultures passées une fois à une concentration protéique approximative, et une ou deux fois à 7,5 µg de protéines/ml, tournait autour de 30 à 40 %, 60 à 80% et de 90 à plus de 95 %, respectivement (résultats non montrés). Selon le nombre de passages et la densité d'inoculation d'une préculture, la proportion de cellules en phase exponentielle de croissance qu'elle contient pourrait différer. Il est probable qu'une préculture passée une fois à une concentration protéique approximative comporte une faible proportion de ces cellules alors que des cultures passées une fois ou deux fois à 7,5 µg de protéines/ml en renferment une proportion élevée à très élevée, respectivement. D'autre part, les résultats obtenus coïncident avec les observations de Gagnon (2015), selon lesquelles l'obtention d'hyphes toruleux en condition inductrice, chez ACN14a, s'avérait beaucoup plus laborieuse pour des cellules en phase exponentielle de croissance que des cellules en phase stationnaire de croissance. Selon l'auteure, les cultures en phase stationnaire de croissance se différenciaient massivement alors que les cultures en phase exponentielle de croissance étaient non inductibles. Par ailleurs, il importe de mentionner que les résultats d'une seconde expérience démontrent aussi une différenciation cellulaire optimale lorsqu'une préculture est passée à 15 µg de protéines/ml plutôt qu'à des concentrations protéiques inférieures de 7,5 ou ~ 5 µg de protéines/ml (la concentration protéique approximative dosée à ce moment). Les résultats ont également démontré une différenciation cellulaire plus optimale lorsque l'inoculum était homogénéisé avec 10 ou 20 coups de piston plutôt que 0 ou 5 coups de piston (résultats non montrés). Une expérience supplémentaire a également appuyé l'importance qu'occupe le traitement d'homogénéisation à la seringue pour l'obtention massive d'hyphes toruleux. Effectivement, une absence d'homogénéisation de l'inoculum diminuait grandement la capacité des cultures d'ACN14a à se différencier vers le morphotype RTH, en milieu inducteur (figure 16B). Il est probable que l'intégrité des parois cellulaires influence l'efficacité du choc osmotique subi en conditions inductrices. Les parois cellulaires bactériennes étant connues pour assurer des rôles de protection et d'adaptation, elles permettent aux microorganismes de s'adapter aux différents environnements. Le peptidoglycane qu'elles contiennent assure, entre

autres, la stabilisation des membranes cellulaires en réponse aux changements de pression osmotique de part et d'autre de la membrane plasmique (Silhavy *et al.*, 2010). Par ailleurs, Lafond-Lambert (2014) et Gagnon (2015) ont noté un épaississement des parois chez des cultures d'ACN14a maintenues en conditions inductrices, suggérant leur importance dans la résistance au stress osmotique. L'homogénéisation à la seringue altérant l'intégrité des parois cellulaires (Furnholm *et al.*, 2012), la stabilisation des membranes s'avère plus difficile à maintenir. Il est donc probable qu'une altération des parois cellulaires via le processus d'homogénéisation à la seringue soit essentielle à l'obtention massive d'hyphes toruleux, le choc osmotique s'avérant peu efficace en présence de parois cellulaires intactes. Des études ont déjà démontré l'effet positif d'une homogénéisation des cultures sur la différenciation cellulaire. Notamment, des cultures de *Frankia* sp. ORS 020608 maintenus en milieu BAP sporuleraient davantage sous une agitation au barreau magnétique (Schwencke, 1991). Par ailleurs, chez *Aspergillus niger* HFD5A-1, les forces de cisaillement et les collisions cellules-cellules entraînées par l'agitation des cultures en bioréacteurs génèreraient des changements morphologiques (Ibrahim *et al.*, 2015). Pour finir, le stress causé par une augmentation de la vitesse d'agitation, chez des cultures de *B. subtilis* EA-CB0575, aurait également permis d'optimiser la production industrielle de spores à l'échelle de bioréacteur (Posada-Urbe *et al.*, 2015). En plus du nombre de passages des précultures, de la densité d'inoculation des de ces dernières, et du degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue, l'âge de l'inoculum s'avère aussi un paramètre important concernant la capacité des cultures d'ACN14a à se différencier vers la morphologie RTH. L'utilisation d'un inoculum d'ACN14a âgé de deux semaines semble optimal pour l'obtention massive d'hyphes toruleux et la reproductibilité des résultats obtenus d'une expérience à l'autre (figure 17A). Tel qu'illustré à la figure 17, le pourcentage de cellules différenciées variait très peu d'une expérience à l'autre, pour un inoculum âgé de 2 semaines, légèrement pour un inoculum âgé de 4 semaines, et s'avérait très variable et non reproductible pour un inoculum âgé de 8 semaines. Chez *Brevibacterium linens*, lorsque des cultures en fin de phase exponentielle de croissance subissent une carence en nutriments, on observe un épaississement de la paroi cellulaire significatif (Boylen et Mulks, 1978). Un épaississement et une augmentation du degré de septation des hyphes sont fréquemment observés en laboratoire chez de vieilles cultures de *Frankia* spp. De plus, l'observation des précultures la veille de l'expérience a permis de constater la présence d'hyphes végétatifs non élargis chez les cultures âgées de 2 semaines, d'hyphes végétatifs

plutôt épaissis et légèrement septés chez les cultures âgées de 4 semaines, et d'hyphes épaissis et davantage septés chez les cultures âgées de 8 semaines (résultats non montrés). L'épaisseur des parois cellulaires n'a pas été mesurée chez les précultures âgées de 2, 4 et 8 semaines. Malgré tout, il est possible que les cellules aient subi certaines carences en nutriments, suivant une incubation prolongée des cultures. Si ce scénario est exact, il est probable que, tout comme chez la bactérie du sol *B. linens*, la paroi des hyphes d'ACN14a augmente en épaisseur suivant une incubation prolongée des cultures. Si l'hypothèse émise précédemment, selon laquelle l'homogénéisation d'un inoculum à la seringue est indispensable à l'obtention massive d'hyphes toruleux, est vraie, les résultats obtenus ne sont pas surprenants. Le stress osmotique en condition inductrice s'avèrerait donc suffisant pour induire une différenciation cellulaire massive, soutenue et reproductible chez un inoculum âgé de 2 semaines. Chez des inocula âgés de 4 et 8 semaines, l'homogénéisation s'avèrerait moins efficace en raison d'un épaississement des hyphes. Pour ces inocula, le choc osmotique pourrait donc s'avérer moins suffisant ou insuffisant, respectivement, pour permettre la différenciation massive, soutenue et reproductible vers l'hyphe toruleux. L'ensemble des résultats présentés confirme donc la nécessité et l'importance du traitement d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue et d'une concentration protéique avoisinant les 15 µg/ml pour l'obtention massive d'hyphes toruleux chez la souche ACN14a.

À l'opposé de ce qui est observé chez la souche ACN14a, aucun RTH n'est observé en conditions inductrices chez ACN10a, confirmant les résultats obtenus par Gagnon (2015). Chez cette souche, lorsqu'une préculture est passée une fois à 7,5 µg de protéines/ml, on observe majoritairement des renflements sur les hyphes en conditions inductrices (figure 12E-G). Au contraire, lorsqu'une préculture est passée deux fois à 7,5 µg de protéines/ml, des sporanges terminaux et intercalaires sont majoritairement observés en milieux inducteurs contenant 50 mM de KH₂PO₄ et 40 mM de KCl, plutôt que de simples renflements (figure 15D-F). Chez la souche ACN10a, une augmentation du nombre de passages d'une préculture semble donc favoriser la formation de sporanges en conditions BAPS KH₂PO₄ 50 mM pH 5,85 et BAPS KCl 40 mM pH 5,85. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, une plus grande sporulation des cellules est observée lorsqu'un milieu riche est employé pour la croissance des précultures, plutôt qu'un milieu pauvre. Lors du transfert des cellules en

milieu de sporulation, une préculture ayant proliféré en milieu riche subirait un plus grand stress, ce qui résulterait en un événement de sporulation plus efficace (Bilinski *et al.*, 1987). Il est probable qu'un phénomène similaire soit à l'origine de l'apparition de sporanges chez la souche ACN10a. Tout d'abord, les précultures d'ACN10a passées deux fois à 7,5 µg de protéines/ml présentent une plus grande viabilité cellulaire que les précultures passées une fois à cette concentration protéique (résultats non montrés). Il est donc possible, qu'au moment d'induire la différenciation cellulaire, une culture passée une fois à 7,5 µg de protéines/ml soit majoritairement constituée de cellules en fin de phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance, et qu'une culture passée deux fois à 7,5 µg de protéines/ml soit principalement constituée de cellules en début ou milieu de phase exponentielle. Ayant consommé la majorité des nutriments durant la phase de croissance, les cellules passées une fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml se trouveraient dans un milieu plus pauvre en nutriments, au moment de démarrer l'expérience, que les cellules passées deux fois à cette concentration protéique. Tout comme chez *S. cerevisiae*, il est possible qu'une concentration supérieure en nutriments, au moment d'induire, stimule la formation de sporanges chez ACN10a, en milieux supplémentés en KH_2PO_4 et en KCl. La viabilité cellulaire observée en condition BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 se rapproche davantage de ce qui est observé en condition BAPS, il est probable que le stress résultant, au moment d'induire, soit sous-optimal pour l'obtention de sporanges dans cette condition. Il reste tout de même difficile de tirer des conclusions de ces résultats, vu la très faible viabilité des cultures en milieux inducteurs (figure 13). Il est à noter qu'une absence d'homogénéisation des cultures d'ACN10a n'augmente pas la viabilité cellulaire en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, tel qu'observé chez la souche ACN14a (figure 16E). Malgré tout, une diminution de moitié de la concentration en KH_2PO_4 augmente significativement la viabilité des cellules. Cette viabilité cellulaire supérieure s'accompagne également d'une plus grande aptitude des hyphes à se différencier dans cette condition, car les hyphes sont élargis et arborent de nombreuses structures bombées (figure 16E et F). Il est probable que le stress osmotique en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85 soit trop élevé pour permettre une différenciation cellulaire optimale chez ACN10a. Il est possible qu'une absence d'homogénéisation des cultures et qu'une diminution de la concentration en KH_2PO_4 de moitié, diminue considérablement le choc osmotique subi chez cette souche, résultant en une viabilité et une différenciation cellulaire supérieures. Les deux souches étudiées possèdent des génomes très semblables (Sébastien Roy, communication

personnelle). Comme la viabilité cellulaire dans nos conditions de culture est souvent plus faible chez ACN10a, il est possible que l'état physiologique des précultures, au moment de démarrer une expérience, soit incompatible avec le processus de différenciation cellulaire vers l'hyphe toruleux. Un criblage plus approfondi des différents paramètres impliqués dans le maintien des cultures et la préparation de l'inoculum pourrait permettre d'en apprendre davantage sur le sujet.

4.2 Évaluation du potentiel antimicrobien chez *Frankia* sp.

Les actinomycètes sont connus pour être de grands producteurs d'antibiotiques (Kumar *et al.*, 2010). Le genre *Streptomyces* étant très exploité à l'échelle industrielle pour de telles productions (Chaudhary *et al.*, 2013; Rabyk *et al.*, 2014; Udvary *et al.*, 2011), ce n'est pas encore le cas pour les bactéries appartenant au genre *Frankia*. Malgré tout, plusieurs antibiotiques ont déjà été caractérisés chez *Frankia* sp., et des études de protéomique et de génomique ont identifié plusieurs ilots de gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse d'antibiotiques et de lantibiotiques chez le genre *Frankia* (Gerber et Lechevalier, 1984; Haansuu, 2002; Klika *et al.*, 2001; Marsh *et al.*, 2010; Medentsev *et al.*, 1989; Ogasawara *et al.*, 2015; Sarma *et al.*, 2003; Udvary *et al.*, 2011). Par ailleurs, tel que mentionné plus tôt, plusieurs éléments sont connus pour influencer la production d'antibiotiques chez les actinomycètes, notamment, la concentration protéique (El-Enshasy *et al.*, 2000; Gagnon, 2015), ainsi que l'âge (Saffroy, 2006) et le degré d'homogénéisation des cultures (Ibrahim *et al.*, 2015). Durant le projet, plusieurs paramètres ont été étudiés en vue d'en évaluer leur effet sur la production d'antibiotiques chez les souches ACN14a et ACN10a. Les paramètres étudiés étaient le nombre de passages et la densité d'inoculation des précultures, le degré d'homogénéisation d'un inoculum à la seringue, et l'âge des cultures.

De manière générale, chez la souche ACN14a, l'activité antimicrobienne de la phase aqueuse semble supérieure pour une préculture passée une fois à 15 µg de protéines/ml, et son activité semble diminuer avec une augmentation du nombre de passage à plus faible densité cellulaire

(figures 18, 19 et 21). En effet, lorsqu'une préculture était passée une fois à une concentration protéique approximative, qui, à cette époque, tournait autour de 15 à 20 µg de protéines/ml, des zones d'inhibition de croissance de grande taille associées à la phase aqueuse et ciblant *E. coli* MC4100 *imp4213* étaient perçues durant l'entièreté de l'expérience, dans les quatre conditions employées (figure 18, tableau 2). Un passage des cellules à 7,5 µg de protéines/ml entraînait une chute drastique de ce potentiel antimicrobien, des zones d'inhibition de croissance de très faible intensité étant observées des jours 25 à 54 seulement, en milieu BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7 seulement (figure 19B et E). Finalement, suivant deux passages des précultures à une concentration protéique de 7,5 µg/ml, malgré la taille moyenne des zones d'inhibition observées envers *E. coli* MC4100*imp4213*, la diversité du potentiel antimicrobien de la phase aqueuse diminue, des zones d'inhibition de croissance étant seulement observées envers cette souche (figure 21A et B).

D'autre part, les extraits de surnageant de cultures d'ACN14a semblent plus actifs contre les bactéries à Gram négatif que les bactéries à Gram positif, une seule zone d'inhibition de croissance étant détectée envers *B. subtilis* ATCC6633 pour une préculture passée une fois à 7,5 µg de protéines/ml ou à une concentration protéique approximative, et une absence de zones d'inhibition étant observée pour une préculture passée deux fois à 7,5 µg de protéines/ml (figures 18, 19C et 21). Comme nos extraits sont incolores et que les benzonaphacènes quinones et la frankiamicine A isolée chez *Frankia* sp. sont de couleur rouge et orangée, respectivement (Gerber et Lechevalier, 1984; Ogasawara *et al.*, 2015), les molécules ciblant *E. coli* MC4100 *imp4213* ne devraient pas correspondre à ces antibiotiques. Comme des îlots de gènes associés à la biosynthèse d'aminosides ont déjà été identifiés chez la souche ACN14a (Udwary *et al.*, 2011), et que ces derniers sont reconnus pour leur efficacité envers *E. coli* (Clark, 1977), le potentiel antimicrobien observé envers *E. coli* MC4100 *imp4213* pourrait plutôt résulter de la présence d'antibiotiques appartenant à la classe des aminosides. D'autre part, une expérience supplémentaire a aussi démontré une augmentation du potentiel antimicrobien associé à la phase organique envers *B. subtilis* ATCC6633, chez la souche ACN14a, suivant une augmentation de la densité d'inoculation des précultures (résultats non montrés). Chez ACN14a, les zones d'inhibition de croissance observées envers *B. subtilis* ATCC6633 pour une préculture passée une fois à une concentration protéique approximative

et pour cette expérience supplémentaire pourraient résulter de la présence de l'antibiotique frankiamide. En effet, la frankiamide ayant été extraite à l'acétate d'éthyle, étant incolore, et présentant une activité antibiotique envers *B. subtilis* ATCC6633 (Haansuu, 2002; Klika *et al.*, 2001), le potentiel antimicrobien associé à la phase organique et ciblant *B. subtilis* ATCC6633 pourrait possiblement résulter de la présence de cette molécule. Il est déjà connu que la densité d'inoculation d'une préculture d'ACN14a influence l'état physiologique des cultures subséquentes (Gagnon, 2015). Par ailleurs, il a été démontré par El-Enshasy *et al.* (2000) que la densité d'inoculation de cultures de *Streptomyces natalensis* affectait le niveau de production de l'antibiotique natamycine. Les rendements en natamycine s'avéraient optimaux seulement lorsque la densité d'inoculation représentait 2×10^8 spores/ml (El-Enshasy *et al.*, 2000). Les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques étant souvent associés chez les actinomycètes (Bibb, 2005), et la densité d'inoculation influençant à la fois la différenciation cellulaire chez ACN14a (Gagnon, 2015) et la production d'antibiotiques chez *S. natalensis*, il est possible que la densité d'inoculation des précultures influence la production subséquente d'antibiotiques chez *Frankia* sp. Par manque de volume, l'activité des extraits de surnageant pour une préculture passée à une concentration protéique approximative n'a pas été évaluée envers des souches d'intérêt clinique. Toutefois, lorsqu'une préculture d'ACN14a est passée une fois à 7,5 µg de protéines/ml, la phase aqueuse présente une activité antibiotique envers *P. aeruginosa* ATCC27853 (figure 19B et F) et la phase organique présente un potentiel antimicrobien envers *E. faecalis* ATCC29212 (figure 19A et D).

Les actinomycètes étant reconnus pour produire une multitude de métabolites secondaires (Solecka *et al.*, 2012), il est vraisemblable de croire que différentes molécules soient responsables des différents signaux antibiotiques détectés. Par ailleurs, la frankiamide, en plus d'être active contre *B. subtilis* ATCC6633 et *E. faecalis* ATCC29212, est aussi active contre *S. aureus*. Comme aucune zone d'inhibition de croissance n'est observée envers *S. aureus* pour les extraits provenant d'une culture d'ACN14a dont la préculture avait été passée une fois à une concentration protéique de 7,5 µg de protéines/ml, il semble plutôt improbable que le potentiel antimicrobien observé envers *E. faecalis* ou *B. subtilis* dans ces conditions résulte de la présence de cette molécule (Klika *et al.*, 2001). Le potentiel antimicrobien observé en phase organique pourrait résulter de la présence de l'antibiotiques, puisque ces derniers sont pour la

plupart actifs contre les bactéries à Gram positifs et inactifs contre les bactéries à Gram négatif (Kastin, 2013). La présence d'un îlot de gènes associé à la biosynthèse de lantibiotiques de type I chez la souche ACN14a renforce cette supposition (Marsh *et al.*, 2010). D'autre part, comme des gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse d'aminosides ont été identifiés chez ACN14a, et que ces antibiotiques s'avèrent particulièrement actifs envers *Pseudomonas* sp. et plutôt actif envers *E. coli* (Clark, 1977; Udway *et al.*, 2011), il est probable que le signal antibiotique observé en phase aqueuse résulte de la présence d'antibiotiques aminosides.

Il est à noter qu'une apparition ou disparition de certaines zones d'inhibition de croissance se produit régulièrement suivant le premier essai d'antibiogramme. Ce phénomène peut être causé par plusieurs facteurs. D'une part, la température d'entreposage (Hou et Poole, 1969; Hsieh *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2004), la matrice (Hsieh *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012), la présence d'enzymes de dégradation (Hou et Poole, 1969; Sun *et al.*, 2004), d'agents catalytiques organiques (Hou et Poole, 1969; Sun *et al.*, 2004), d'ions métalliques (Hou et Poole, 1969; Sun *et al.*, 2004; Xuan *et al.*, 2010), de certains sucres (Bundgaard et Larsen, 1978), ainsi que le degré d'humidité (Hou et Poole, 1969; Sun *et al.*, 2004) et le pH (Hou et Poole, 1969; Sun *et al.*, 2004; Xuan *et al.*, 2010), sont tous des paramètres pouvant influencer la stabilité et la vitesse de dégradation des molécules antibiotiques. La dégradation structurelle de la plupart des antibiotiques étant en accord avec une réduction du potentiel antimicrobien (Hsieh *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2004), il est probable que certains composés aient subi une dégradation structurelle à un seuil ne permettant plus leur détection. D'autre part, tel qu'observé lors du chauffage de certains antibiotiques, il est probable qu'une dégradation structurelle des composés ait mené à l'acquisition d'une toxicité des extraits via la formation de produits de dégradation toxiques (Hsieh *et al.*, 2011). Il est aussi possible que les produits de dégradation générés inversent le phénotype de résistance chez *B. subtilis* ATCC6633, tel qu'observé chez *E. coli* suivant la dégradation structurelle de l'antibiotique tétracycline (Palmer *et al.*, 2010).

Il importe de mentionner qu'à l'opposé de ce qui est observé chez la souche ACN14a, la phase aqueuse des extraits de surnageant de cultures d'ACN10a est inactive. Toutefois, tout comme observé chez ACN14a concernant la phase aqueuse, le potentiel antimicrobien de la phase organique diminue avec une augmentation du nombre de passage à 7,5 µg de protéines/ml (tableau 3). Dans les quatre conditions, les zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique et ciblant *B. subtilis* ATCC6633 disparaissent lors d'un deuxième passage des cellules à 7,5 µg de protéines/ml (figure 20 et tableau 3). D'autre part, des zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique et ciblant *P. aeruginosa* ATCC27853 sont observées en condition BAPS (figure 20A et F). L'activité antibiotique envers *P. aeruginosa* ATCC27853 étant associée à différents milieux et différentes phases, chez ACN14a et ACN10a, il est raisonnable de penser qu'elle est issue de molécules bioactives distinctes (figure 19B et F, figure 20). Les souches en question présentent une grande similarité de génomes (communication personnelle, Sébastien Roy). Comme des îlots de gènes associés à la biosynthèse d'aminosides et de lantibiotiques ont déjà été identifiés chez ACN14a, il est possible qu'un antibiotique appartenant à la classe des aminosides soit responsable du signal antibiotique observé envers *P. aeruginosa* chez ACN10a et qu'un lantibiotique soit responsable du potentiel antimicrobien observé envers *B. subtilis* chez cette même souche.

Par ailleurs, un phénomène plutôt intéressant est observé chez les deux souches étudiées lorsqu'on cesse d'homogénéiser l'inoculum. En effet, à l'opposé de la souche ACN10a, pour qui un potentiel antimicrobien soutenu avait déjà été observé en phase organique, l'activité antibiotique des extraits de surnageant de cultures d'ACN14a était davantage associée à la phase aqueuse. Lorsqu'on cesse d'homogénéiser l'inoculum, une activité antibiotique plutôt soutenue et ciblant uniquement *B. subtilis* ATCC6633 est observée en phase organique, en condition BAPS et BAPS modifié chez ACN14a (figure 22). En absence d'homogénéisation, il y a donc disparition de l'activité antibiotique associée à la phase aqueuse et apparition d'une activité antibiotique associée à la phase organique. La cible du pouvoir antibiotique change également, passant d'une bactérie à Gram négatif à une bactérie à Gram positif. Il est connu que le degré d'agrégation des hyphes influence la production d'antibiotiques chez les actinomycètes. Notamment, chez *Streptomyces noursei* NG7.19, les agrégats formés en milieu liquide augmentent de taille jusqu'à un seuil critique pour l'approvisionnement en oxygène et

autres nutriments, résultant alors en un arrêt de croissance et une production de nystatine (Jonsbu *et al.*, 2002). Pareillement, chez *S. lividans*, la formation d'agrégats compacts semble être un prérequis pour la production d'un antibiotique hybride, alors que des agrégats de plus petite taille semblent être optimaux pour la production de tylosine par *Streptomyces fradiae* (Tamura *et al.*, 1997). À l'opposé, un mycélium fongique filamenteux et relâché favorise une biosynthèse plus accrue de pénicilline (Lawton *et al.*, 1989). Il est donc probable que, chez la souche ACN14a, une biomasse relâchée favorise la production d'un antibiotique hydrophile actif contre *E.coli* MC4100 *imp4213*, et qu'une biomasse agrégée soit défavorable à la production du même antibiotique, en raison d'un manque de diffusion d'oxygène et de nutriments vers le centre des agrégats. Au contraire, ces conditions pourraient promouvoir la synthèse d'un antibiotique plus hydrophobe et actif contre *B. subtilis* ATCC6633 chez *Frankia* sp. Par ailleurs, lorsque l'inoculum est non homogénéisé, le signal antibiotique observé pour une même condition s'avère pratiquement identique chez ACN14a et ACN10a (figure 22). Le génome chez ces deux souches étant très similaire, il est probable que des gènes analogues ou même identiques soient à l'origine du signal antibiotique observé. La reproductibilité du signal antibiotique, d'un passage et d'un réplica à l'autre (figure 22), pourrait résulter de l'échange de signaux plus spécifiques et efficaces au sein des agrégats de cellules (Kalakoutskii et Agre, 1976). Les cellules étant plus rapprochées, une régulation plus fine du métabolisme secondaire pourrait être à l'origine de cette reproductibilité.

Outre le nombre de passages des précultures, leur densité d'inoculation, et le degré d'homogénéisation de l'inoculum à la seringue, l'âge de l'inoculum s'avère à être un paramètre déterminant concernant la production de métabolites antibiotiques chez la souche ACN14a. Que l'inoculum soit âgé de 2, 4 ou 8 semaines, les phases aqueuse et organique des extraits présentent une activité antibiotique ciblant le Gram positif *B. subtilis* ATCC6633. L'emploi d'un inoculum âgé de quatre semaines accentue le potentiel antimicrobien des cultures. En effet, pour un inoculum âgé de quatre semaines, des zones d'inhibition de croissance associées à la phase organique sont également perçues envers les bactéries à Gram négatif *E. coli* MC4100 *imp4213* et *E. coli* MC4100 *acrAB*, et les bactéries à Gram positif *E. faecium* ATCC35667 et *S. aureus* ATCC29213 (figure 23). Nos observations coïncident avec celles de Saffroy (2006), pour qui l'âge d'un inoculum influençait significativement la production

d'antibiotiques chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Des cultures dont l'inoculum était âgé de 46 h s'avéraient incapables de produire les pristinamycines, alors que des cultures dont l'inoculum était âgé de 28, 36, 72 et 96 heures étaient en mesure de le faire (Saffroy, 2006). Il a également été démontré par El-Enshasy *et al.* (2000) que la production de natamycine, chez *Streptomyces natalensis*, diminuait avec l'âge de l'inoculum. L'antibiotique frankiamide caractérisé chez *Frankia* sp. AiPs1 (Klika *et al.*, 2001) étant actif envers *B. subtilis* ATCC6633 et *Staphylococcus aureus*, il s'avère également actif envers *E. faecalis* ATCC29212 et *Streptococcus pyogenes*, ce qui n'est pas le cas de nos extraits. D'autre part, il importe de mentionner que le potentiel antimicrobien est différent pour une préculture passée une fois à une concentration protéique approximative (expérience A) et pour un inoculum âgé de deux semaines (expérience D). Ces essais s'avérant pratiquement identiques, plusieurs paramètres plus difficiles à contrôler peuvent influencer la reproductibilité des résultats obtenus d'une expérience à l'autre. La provenance d'un inoculum, la fréquence et la densité cellulaire au moment des passages, le nombre total de passages effectués depuis la décongélation des inocula, l'efficacité du traitement d'homogénéisation à la seringue (influencée par la viscosité de l'inoculum et la force appliquée), sont tous des facteurs pouvant influencer l'état physiologique des précultures, et donc la reproductibilité des expériences subséquentes.

De nombreux gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse d'antibiotiques et de lantibiotiques encore non caractérisés ont été identifiés chez ACN14a (Udwary *et al.*, 2011). Les souches ACN14a et ACN10a présentant de grandes similarités de génomes, il est fort probable que le potentiel biosynthétique attribué à la souche ACN14a le soit aussi pour ACN10a. La structure des molécules bioactives n'ayant pas été élucidée lors du présent projet, il reste difficile de déterminer quel type de molécules s'avèrent responsables du potentiel antibiotique observé. Malgré tout, les expériences effectuées ont permis de démontrer que chez ACN14a, tout comme chez ACN10a, le nombre de passages d'une préculture influence grandement la capacité des cellules à produire des antibiotiques, et que chez la souche ACN14a, la densité cellulaire lors des passages des précultures, ainsi que le degré d'homogénéisation et l'âge d'un inoculum, influencent aussi grandement le métabolisme secondaire.

4.3 Évaluation du lien entre la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques chez *Frankia* sp.

Chez les actinomycètes, la synthèse des métabolites secondaires coïncide ou précède régulièrement les événements de sporulation (Bibb, 2005; Hoskisson *et al.*, 2001). Sauf pour une exception connue chez *Amycolatopsis mediterranei* (Yu *et al.*, 1999), les gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires sont disposés en îlots comprenant des gènes régulateurs ayant pour rôle de contrôler l'expression de l'ensemble des gènes présents. Certains gènes régulateurs, tels les gènes *bld* des streptomycètes, sont aussi impliqués dans la formation du mycélium aérien et des spores (Bibb, 2005). Les processus de différenciation cellulaire et de biosynthèse de métabolites secondaires étant souvent intimement associés chez les actinomycètes (Hopwood, 1988), et le genre *Frankia* étant encore aujourd'hui très peu étudié, il importait d'y évaluer le lien existant entre ces deux événements. Ce dernier a donc été évalué chez les souches ACN14a et ACN10a, en se basant sur les expériences d'optimisation de la différenciation cellulaire et les essais d'antibiogrammes effectués.

Chez la souche ACN14a, le potentiel antimicrobien de la phase aqueuse semble associé aux événements de différenciation vers la morphologie RTH, ce dernier étant supérieur en conditions inductrices, et diminuant graduellement suivant une diminution de la capacité des cellules à se différencier (tableau 3 expériences A1, A2, A3 et B, figures 9, 11, 14, 18, 19 et 21). Selon l'étude de transcriptomique réalisée par Bernèche-D'Amours (2012), plusieurs gènes associés ou potentiellement associés à la biosynthèse d'antibiotiques sont largement surexprimés, chez ACN14a, lors d'une différenciation massive vers l'hyphe toruleux. Par ailleurs, chez les actinomycètes il arrive régulièrement que les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques soient intimement associés (Hopwood, 1988). Notamment, chez *S. griseus* le facteur A est requis à la fois pour le métabolisme secondaire et la différenciation morphologique (Bibb, 2005; Flärdh et Buttner, 2009; Horinouchi et Beppu, 1994; Horinouchi et Beppu, 2007; Shapiro, 1989). Ce phénomène est aussi constaté chez *S. coelicolor*. Chez ce microorganisme, un gène nommé *bldA* est à la fois requis pour les

événements de différenciation morphologique et de production d'antibiotiques (Demain, 1992), et un récepteur nommé CprA servirait d'activateur à la fois pour la biosynthèse d'antibiotiques et la sporulation (Takano, 2006). Chez *S. coelicolor*, BldD agirait aussi comme un régulateur transcriptionnel indispensable au développement morphologique et à la production des pigments antibiotiques actinorhodine et undecylprodigiosine (Chater, 1998; Hengst *et al.*, 2010; Kelemen et Buttner, 1998; Viollier *et al.*, 2001). Finalement, chez *S. lividans*, la composante AdpA influencerait à la fois l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la coelichelin et l'expression des gènes associés aux événements de différenciation cellulaire (Guyet *et al.*, 2014).

Il existe souvent un lien entre les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques chez les actinomycètes, et une surexpression de gènes potentiellement impliqués dans la production d'antibiotiques est observée chez des cultures d'ACN14a massivement différenciées vers le morphotype RTH. La présence d'un lien entre l'activité antibiotique de la phase aqueuse et le processus de différenciation cellulaire vers l'hyphe toruleux n'est alors pas étonnante chez cette souche. Il est probable que certains gènes soient impliqués à la fois dans les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques chez cette souche, tout comme observé chez *S. griseus*, *S. coelicolor* et *S. lividans*. Il importe de mentionner que pour une préculture d'ACN14a passée une fois à une concentration protéique approximative, les zones d'inhibition de croissances associées à la phase aqueuse présentent toujours des diamètres plus élevés en milieux inducteurs qu'en milieu BAPS (tableau 2). Chez *S. coelicolor* la production d'antibiotiques peut être intimement associée aux événements de différenciation cellulaire, ou en être complètement indépendante (Bibb, 2005; Demain, 1992; Takano *et al.*, 2001). Il n'est donc pas impossible que des molécules bioactives soient produites en milieux BAPS et inducteurs, indépendamment de la différenciation cellulaire, et qu'une ou plusieurs molécules bioactives intimement associées à la différenciation cellulaire soient produites en milieux inducteurs seulement, augmentant ainsi la taille des zones d'inhibition de croissance observées envers *E. coli* MC4100 *imp4213* dans ces conditions. D'autre part, contrairement à ce qui était observé chez ACN14a, aucun potentiel antimicrobien associé à la phase aqueuse n'a été détecté chez ACN10a, malgré une différenciation moindre ou élevée des cellules (tableau 3 expériences A2, A3 et B, figure 12D,

E, F, G et figure 15D, E, F et 20). Il est tout de même important de considérer le très faible pourcentage de viabilité des cultures chez cette souche en milieu de différenciation (figure 13). Comme peu de cellules sont viables, il est possible que des antibiotiques soient produits par cette biomasse, mais qu'ils ne soient pas détectés, leur concentration se situant sous la limite de détection de la méthode employée.

Chez la souche ACN14a, le potentiel antimicrobien associé à la phase organique et les événements de différenciation cellulaire ne semblent pas être indissociables, puisque l'activité antibiotique de cette phase ne diminue pas suivant une incapacité des cellules à se différencier (tableau 3 expériences A1, A2, A3 et B, figures 9, 11, 14, 18, 19 et 21). Une faible activité antibiotique a également été détectée pour cette phase en absence de différenciation cellulaire alors qu'une absence d'activité antibiotique a été constatée en présence d'hyphes torueux (tableau 3 expérience A1). De même, une absence de différenciation cellulaire et une activité antibiotique moyennement élevée ont été constatées lorsque les cultures étaient passées sans homogénéisation de l'inoculum (tableau 3 expérience B, figures 16A, B et 22A). Malgré la fréquence d'un lien existant entre les événements de différenciation cellulaire et de production de métabolites secondaires chez les actinomycètes, il arrive parfois que ces deux événements surviennent seuls. Chez *S. virginiae*, des butanolides contrôlent la production de virginiamycine uniquement, et ne sont pas impliqués dans les processus de différenciation cellulaire (Bibb, 2005). Pareillement, le composé IM-2 élicite uniquement la biosynthèse des antibiotiques nucléosides showdomycine et minimycine chez *S. lavendulae* (Bibb, 2005; Kitani *et al.*, 2001) et le composé SCB1 induit uniquement la production des pigments antibiotiques Act et Red chez *S. coelicolor* (Bibb, 2005; Takano *et al.*, 2001). Dans ces cas, à l'opposé de ce qui est observé pour le facteur-A, les γ -butyrolactones ne sont pas requises pour la différenciation cellulaire et régulent uniquement la production d'antibiotique, c'est deux événements s'avérant donc distincts (Bibb, 2005; Horinouchi et Beppu, 1994). Il importe également de mentionner que lorsqu'un inoculum d'ACN14a âgé de 4 semaines est employé, une production d'antibiotiques précède légèrement l'apparition de RTH (figures 17B et 23B). Chez les streptomycètes, la production de métabolites secondaires coïncide ou précède légèrement le développement des hyphes aériens sur milieu solide (Bibb, 2005). Ce phénomène ayant déjà été répertorié chez les actinomycètes et une surexpression de gènes associés à la production

d'antibiotique en condition inductrice ayant été constatée par Bernèche-D'Amours chez cette souche, nos observations ne sont pas surprenantes. Chez la souche ACN10a, tout comme chez ACN14a, il arrive que l'activité antibiotique associée à la phase organique soit plus élevée en absence de différenciation cellulaire qu'en présence d'hyphes toruleux (tableau 3 expérience A2, figure 12D, E, F et G, figure 20). Par exemple, pour une préculture d'ACN10a passée une fois à 7,5 µg de protéines/ml, des zones d'inhibition de croissance sont observées envers *P. aeruginosa* ATCC27853 et *B. subtilis* en condition BAPS alors que des zones d'inhibition sont seulement observées envers *B. subtilis* ATCC6633 en conditions inductrices (figure 20). Il arrive aussi que le potentiel antimicrobien de la phase organique soit complètement nul ou moyennement élevé, que les hyphes soient différenciés ou non (tableau 3 expériences A3 et B, figure 15D, E et F, figure 20, figure 16C, D et E, et figure 22D et G.). Considérant l'implication chez les actinomycètes de plusieurs γ -butyrolactones dans les processus de biosynthèse d'antibiotiques uniquement et ce, indépendamment des événements de différenciation cellulaire (Bibb, 2005), ces observations s'avèrent plausibles. Au final, chez la souche ACN14a, le potentiel antimicrobien de la phase aqueuse semble étroitement associé aux événements de différenciation cellulaire. À l'opposé, aucun lien indissociable ne semble exister entre la différenciation cellulaire vers l'hyphes toruleux et le potentiel antimicrobien associé à la phase aqueuse, chez ACN10a, et à la phase organique, chez ACN14a et ACN10a.

4.4 Implication du CO₂ dans les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques

Le carbone est la sous-unité de toute forme de vie sur terre. Dans la nature, celui-ci existe sous une large variété de composés organiques et inorganiques et le cycle du carbone s'avère grandement impliqué dans la circulation des diverses formes de carbone entre l'atmosphère, l'hydrosphère, la lithosphère et la biosphère (Saini *et al.*, 2011). Le CO₂ s'avère une importante forme de carbone inorganique, cette dernière représentant l'unique source de carbone inorganique pour les plantes et les microorganismes autotrophes. Cette source de carbone est utilisée par les organismes via le processus de fixation du CO₂, ce dernier permettant la conversion du CO₂ inorganique en biomasse organique. Par ailleurs, plusieurs actinomycètes

sont connus pour présenter cette habileté (Saini *et al.*, 2011). Notamment, chez *Frankia* sp. Cpl1 et *Frankia* sp. Avcl1, une stimulation de la croissance a déjà été observée sous un environnement enrichi en CO₂, en présence de sources de carbone organique (Akkermans *et al.*, 1983; Shipton et Burggraaf, 1983). Akkermans *et al.* (1983) ayant constaté une activité propionyl-CoA carboxylase et la présence d'enzymes du cycle de Krebs chez ces souches, et Shipton et Burggraaf (1983) y ayant proposé l'existence de la voie du 3-hydroxypropionate, il est probable qu'une fixation du CO₂ soit médiée par les voies du cycle de Krebs réducteur ou du 3-hydroxypropionate chez ces souches. Toutefois, ces études n'ont pas été réalisées chez la souche ACN14a, et ne discutaient pas de l'effet du CO₂ sur le métabolisme secondaire.

Les conclusions de ces études pourraient cependant expliquer l'effet de bordure observé chez ACN14a (figure 24). D'une part, il est probable qu'une limitation de la diffusion des gaz au centre de la plaque ait favorisé l'accumulation du CO₂ dégagé par les cellules, favorisant du coup la prolifération cellulaire et un métabolisme actif des hyphes. À l'opposé, la diffusion supérieure des gaz en périphérie de la plaque aurait plutôt favorisé l'élimination du CO₂, la croissance des cellules aurait donc pu ralentir et la différenciation cellulaire se serait produite. Suivant ces résultats chez ACN14a, une séquestration du CO₂ avait également permis l'obtention d'une différenciation cellulaire massive des hyphes en milieu BAPS, à une concentration protéique aussi élevée que 75 µg/ml (Julie Beaudin, communication personnelle). Un moins grand apport en CO₂ ralentirait donc la croissance cellulaire, permettant dès lors la différenciation des hyphes. Un phénomène similaire est répertorié chez plusieurs streptomycètes. Chez ces derniers, la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques auraient lieu en phase stationnaire plutôt qu'en phase active de croissance (Bibb, 2005; Yagüe *et al.*, 2013). Il importe de mentionner qu'une stimulation de la croissance cellulaire, et donc du métabolisme primaire plutôt que secondaire, en présence de CO₂, n'est pas seulement observée à l'échelle de microplaques chez ACN14a, mais également à l'échelle de bioréacteur de 2,2 litres. À cette échelle, une limitation de l'apport en CO₂ limite la prolifération cellulaire (figures 25, 27 et 28A) et favorise la différenciation des hyphes vers la morphologie RTH (figure 25, figure 26A et E, figure 28D). À l'opposé, un enrichissement en CO₂ stimulerait le métabolisme primaire plutôt que secondaire, puisqu'une prolifération cellulaire et une absence

de différenciation des hyphes sont observées (figures 25 et 27B et C). Une concentration inférieure en CO_2 semble donc favoriser un ralentissement de la croissance en cuve, tout comme en plaques, ce qui permettrait d'obtenir les RTH plus facilement. Par ailleurs, plusieurs observations antérieures au laboratoire semblent corroborer les résultats obtenus. En effet, en milieu inducteur BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5.85, une baisse de prolifération est normalement observée, suivi d'une différenciation cellulaire vers le morphotype RTH chez ACN14a (Bernèche-D'Amours, 2012). Toutefois, lorsque ce milieu présente un pH de 6,7, aucune différenciation cellulaire n'est observée au laboratoire (Bernèche-D'Amours, 2012). En fait, le CO_2 se trouve sous plusieurs formes lorsqu'en solution, allant de l'acide carbonique (H_2CO_3), à l'ion bicarbonate (HCO_3^-), sans oublier l'ion carbonate (CO_3^{2-}) (Chen *et al.*, 2016). À partir d'un pH 6,00, le CO_2 dissous, sous la forme d'ion HCO_3^- , serait présent en concentration significativement plus basse qu'à pH plus élevé (Chen *et al.*, 2016). En milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 5,85, la concentration de HCO_3^- s'avèrerait donc plus faible qu'en milieu BAPS KH_2PO_4 50 mM pH 6,7, favorisant dès lors un ralentissement de la croissance, permettant ainsi l'établissement du processus de différenciation chez ACN14a.

Une étude sommaire de la voie de fixation du carbone chez les procaryotes (KEGG pathway, Kanehisa *et al.*, 2016; Larkin *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 1999; Wasmuth et Lima, 2016) a permis de constater que la source de carbone utilisée par les voies du cycle de Krebs réducteur et du 3-hydroxypropionate est l'ion HCO_3^- . Une concentration supérieure de HCO_3^- étant présente à pH 6,7, une concentration supérieure de carbone pourrait être fixée, stimulant dès lors la croissance cellulaire. Avec les résultats de Lafond-Lambert (2014) qui indiquaient qu'un ajout de citrate, d'aconitate et d'alpha-cétoglutarate pouvait inhiber la formation de RTH, l'implication de la voie du cycle de Krebs réducteur semble d'autant plus probable. Une accumulation d'intermédiaires spécifiques, suivant la fixation du HCO_3^- , pourrait bloquer la différenciation RTH et stimuler la croissance cellulaire, corroborant dès lors les résultats de Lafond-Lambert (2014). Par ailleurs, une recherche sommaire à l'aide de l'outil KEGG a démontré la présence de plusieurs gènes codant pour des enzymes clés de la voie du 3-hydroxypropionate (Saini *et al.*, 2011) chez la souche ACN14a. La présence des gènes FRAAL1668 et FRAAL3159 codant pour une enzyme acétyl-CoA carboxylase putative et des gènes FRAAL1210 et FRAAL5672 codant pour une enzyme propionyl-CoA carboxylase putative, suggère également

l'implication de la voie du 3-hydroxypropionate pour fixer le carbone chez cette souche. Chez les actinomycètes, plusieurs études ont constaté une promotion de croissance sous un environnement enrichi en CO₂ (Akkermans *et al.*, 1983; Shipton et Burggraaf, 1983; Ueda *et al.*, 2008). Malgré tout, selon nos connaissances actuelles, la présente étude semble avoir révélé pour la toute première fois, chez *Frankia* sp., la nécessité du CO₂ dans l'établissement d'une prolifération cellulaire (figures 27 et 28A et B). Nos observations suggèrent une fixation du CO₂ par l'entremise du cycle de Krebs réducteur et de la voie du 3-hydroxypropionate (Saini *et al.*, 2011), chez la souche ACN14a, tout comme suggéré pour *Frankia* sp. Avcl1 et *Frankia* sp. Cpl1 par Akkermans *et al.* (1983) et Shipton et Burggraaf (1983).

Malgré qu'une différenciation massive ne soit pas encore observée chez la souche ACN14a à échelle bioréacteur, il est clair qu'une optimisation du processus de différenciation cellulaire vers le morphotype RTH est possible (figures 26E et 28D). Toutefois, la production d'antibiotiques était faible, puisqu'une seule zone d'inhibition de croissance a été observée durant l'entièreté des fermentations (figure 25). Malgré la fréquence d'un lien existant entre les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques chez les actinomycètes, il arrive parfois que ces deux événements soient distincts (Bibb, 2005; Horinouchi et Beppu, 1994; Kitani *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2001). À l'échelle de bioréacteur, l'activité antibiotique en phase organique ne semble pas liée au processus de différenciation cellulaire, puisque des RTH étaient fréquemment perceptibles et qu'une seule zone d'inhibition de croissance avait été observée (figures 25 et 27). Cette hypothèse corrobore les conclusions du chapitre 2 ; en phase organique l'activité antibiotique ciblait *B. subtilis* ATCC6633 et semblait dissociée des événements de différenciation cellulaire (tableau 3). D'autre part, durant la première fermentation, un signal antibiotique était détecté au jour 10 suivant une diminution de l'apport en CO₂ (figure 25). Chez les actinomycètes, il n'est pas rare d'observer une production d'antibiotiques suivant une carence en nutriments (Bibb, 2005). Par exemple, une limitation en azote induirait la production d'antibiotiques chez *S. coelicolor* A3(2) et *S. clavuligerus*, alors qu'une limitation en phosphate induirait la production de métabolites secondaires chez les actinomycètes, les protéobactéries et les champignons filamenteux (Martín, 2004). De façon similaire, plusieurs sources de carbone interféreraient avec la biosynthèse d'antibiotiques, et leur absence en stimulerait régulièrement la production (Sánchez *et al.*, 2010). De façon

similaire, de fortes concentrations de CO₂ sont connues pour inhiber la production de pénicilline chez *Penicillium chrysogenum* (Chester et Smith, 1986). Il est donc possible qu'un apport en CO₂ supérieur à 0.0075 % puisse réprimer la production d'antibiotiques associés à la phase organique, chez ACN14a (tableau 5, figure 25).

Tout comme chez *P. chrysogenum*, une diminution de l'apport en CO₂ pourrait déclencher la production d'antibiotiques chez ACN14a. D'autre part, chez plusieurs actinomycètes, la biosynthèse de métabolites secondaires nécessite la formation de réserves intracellulaires durant la phase exponentielle de croissance (Colombié *et al.*, 2005; Ranade et Vining, 1993). Notamment, l'accumulation d'acétate durant la phase de croissance active serait indispensable à la biosynthèse de l'antibiotique spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens* (Colombié *et al.*, 2005). Similairement, une accumulation de polyhydroxybutyrate fournirait les unités carbonées nécessaires à la biosynthèse de l'actinorhodine chez *S. coelicolor* A3(2), de l'antimycine chez *Streptomyces antibioticus* (Kannan et Rehacek, 1970) et du chloramphénicol chez *S. venezuelae* (Ranade et Vining, 1993). Dès lors, six et quatre jours de croissance active ont été observés préalablement à l'induction des fermenteurs 1 et 2, respectivement (tableaux 5 et 6, figures 25 et 27). Tel que mentionné précédemment, l'accumulation de réserves intracellulaires en phase exponentielle de croissance est souvent essentielle à la biosynthèse d'antibiotiques chez les actinomycètes (Hoskisson *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2010). Comme la croissance active s'est déroulée sur une plus courte période de temps pour la seconde fermentation, il est probable que les réserves intracellulaires accumulées y soient inférieures, entraînant une capacité biosynthétique amoindrie et un signal antibiotique nul. D'autre part, des dosages protéiques ont permis de constater une densité cellulaire généralement inférieure durant la deuxième fermentation (figures 25 et 27). Des antibiotiques pourraient donc avoir été synthétisés selon le même ratio, le signal antibiotique s'avérant tout simplement sous le seuil de détection pour le fermenteur 2, puisqu'une densité cellulaire inférieure y avait été constatée durant l'entièreté de l'expérience. Pour terminer, les résultats obtenus à l'échelle d'ermenmeyers et de fermenteurs corroborent, et tel qu'observé chez plusieurs streptomycètes, le signal antibiotique en phase organique ne semble pas lié aux événements de différenciation cellulaire vers le morphotype RTH.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

Les antibiotiques s'avèrent largement utiles en clinique, permettant de traiter diverses infections et pathologies. Malheureusement, une émergence de souches résistantes aux antibiotiques accompagne généralement leur utilisation. Depuis le début des années 1960, seulement quatre classes d'antibiotiques ont été introduites sur le marché. Dans ses rapports, l'IDSA ne laisse aucune nuance ; la découverte de nouveaux antibiotiques s'avère impérative pour combattre l'émergence de pathogènes résistants aux antibiotiques.

Plusieurs actinomycètes du sol produisent des métabolites antibiotiques pour contrecarrer la compétition dans les environnements pauvres en nutriments. Les actinomycètes, particulièrement les streptomycètes, sont souvent exploités à l'échelle industrielle pour ce type de production. Malgré leurs applications potentielles dans les domaines de l'environnement et de la santé, les actinomycètes appartenant au genre *Frankia* s'avèrent encore aujourd'hui très peu étudiés. Malgré tout, plusieurs antibiotiques ont déjà été caractérisés chez le genre *Frankia*, et des études de génomique et de protéomique ont également mené à l'identification plusieurs îlots de gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse d'antibiotiques chez cet actinomycète.

Chez les actinomycètes, les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques sont souvent intimement associés. Chez *Frankia* spp., différentes morphologies cellulaires ont été identifiées : l'hyphe végétatif, le sporange et la vésicule. Chez la souche ACN14a, une quatrième morphologie cellulaire est parfois observée au laboratoire, il s'agit du *Reproductive torulose hyphae* (RTH). L'apparition sporadique de cette morphologie cellulaire dans différentes conditions de culture suggère qu'elle fait partie intégrante du cycle de vie chez cette souche. Pour faciliter l'étude de la différenciation cellulaire chez le genre *Frankia*,

Bernèche-D'Amours (2012), Lafond-Lambert (2014) et Gagnon (2015) ont développé plusieurs milieux permettant une différenciation cellulaire massive vers l'hyphe toruleux chez la souche ACN14a. Ces milieux induisaient également la formation massive de sporanges chez la ACN10a, une souche génétiquement très rapprochée (Lafond-Lambert, 2015). Malgré tout, plusieurs épisodes sporadiques de non-différenciation ont eu lieu au laboratoire chez ces souches, suggérant que l'état physiologique des cultures influence la capacité des hyphes à se différencier.

D'une part, ce projet visait optimiser la méthode d'induction de la différenciation cellulaire vers le morphotype RTH à l'échelle d'erlenmeyers chez les souches ACN14a et ACN10a, pour obtenir une différenciation massive et reproductible. Un criblage de l'influence sur la différenciation cellulaire de différents paramètres impliqués dans la préparation de l'inoculum au laboratoire a démontré que le nombre de passages d'une préculture, la densité d'inoculation d'une préculture, l'âge d'un inoculum et le degré d'homogénéisation d'un inoculum influençaient l'état physiologique des cultures. Selon l'état physiologique de l'inoculum, les cultures subséquentes présentaient ou non la capacité de se différencier et de produire des antibiotiques. Chez ACN14a, la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques s'avéraient supérieures lorsque la préculture était passée à une concentration protéique autour de 15 à 20 µg de protéines/ml et homogénéisée avec 10 coups de piston. Chez la souche ACN10a, la production d'antibiotiques semblait favorisée par un passage plus restreint des cultures, alors que l'obtention de sporange semblait favorisée par un nombre de passages supérieur des précultures. Basé sur les résultats d'autres études, les résultats suggèrent également qu'une absence d'homogénéisation de l'inoculum, qu'une augmentation de l'âge des cultures, et qu'un état physiologique avancé des cultures pourrait mener à un épaississement de la paroi cellulaire chez *Frankia* spp., entraînant ainsi une diminution de l'efficacité du choc osmotique et donc de la différenciation cellulaire en milieux inducteurs.

Suivant ces résultats, une évaluation du potentiel antimicrobien d'extraits de surnageant de cultures devait nous informer sur la capacité biosynthétique des deux souches à l'étude. Les actinomycètes étant reconnus pour leur grande capacité biosynthétique, nos résultats

démontrent que le genre *Frankia* n'y fait pas exception. Dans certaines conditions, la souche ACN14a présentait une activité antibiotique envers plusieurs souches d'importance clinique telles *E. faecalis*, *E. faecium*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, alors que la souche ACN10a, l'activité antibiotique semblait plutôt limitée à *P. aeruginosa*. Ces deux souches présentant un génome très similaire, et la viabilité cellulaire étant souvent inférieure chez ACN10a dans nos conditions de cultures, il est probable que l'induction de la différenciation cellulaire chez ces deux souches au laboratoire ne se produise pas au même moment de la courbe de croissance. Une étude plus approfondie de l'ensemble des paramètres étudiés chez la souche ACN10a pourrait possiblement permettre d'observer un potentiel antimicrobien plus diversifié. D'autre part, plusieurs paramètres impliqués dans la préparation de l'inoculum au laboratoire ont été démontrés comme influençant la capacité de biosynthèse d'antibiotiques chez ces souches. Notamment, chez la souche ACN14a, l'emploi d'un inoculum âgé de quatre semaines favorisait une activité antibiotique plus diversifiée, et une absence d'homogénéisation de l'inoculum favorisait une activité associée à la phase organique plutôt qu'à la phase aqueuse.

Durant le projet, une analyse plus approfondie de la capacité des cultures à se différencier et à produire des antibiotiques devait nous permettre d'évaluer le lien existant entre la différenciation cellulaire et la production d'antibiotiques chez les souches étudiées. Tel que répertorié chez plusieurs actinomycètes du sol, un lien partiel entre les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques semble présent chez la souche ACN14a. À l'opposé, malgré la similarité génétique chez les deux souches étudiées, aucun lien particulier entre les événements de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques n'a été observé chez la souche ACN10a. Ces résultats suggèrent que les processus de différenciation cellulaire et de production d'antibiotiques chez *Frankia* spp., tout comme chez plusieurs autres streptomycètes, peuvent être régis par des facteurs communs ou indépendants, selon les conditions de culture employées.

Comme l'obtention d'hyphes toruleux et d'antibiotiques à plus grande échelle faciliterait l'étude du métabolisme secondaire chez ACN14a, le projet visait aussi optimiser le métabolisme secondaire chez cette souche à l'échelle de bioréacteur. Deux expériences de fermentation

ont démontré le rôle important qu'occupe le CO₂ au sein du métabolisme chez la souche ACN14a. Alors qu'une absence de CO₂ inhibait la prolifération cellulaire, elle semblait déclencher la différenciation cellulaire des cultures. À l'opposé, la présence de CO₂ stimulait la prolifération cellulaire et inhibait la différenciation vers le morphotype RTH chez cette souche. Chez le genre *Frankia*, une stimulation de la croissance cellulaire sous un environnement enrichi en CO₂ avait déjà été observée auparavant. Malgré tout, les expériences en bioréacteur ont démontré pour la toute première fois une nécessité du CO₂ dans l'établissement de la croissance cellulaire chez ce microorganisme. Basée sur plusieurs observations en lien avec la littérature, notre équipe propose également une fixation du CO₂ chez cette souche via le cycle de Krebs réducteur et la voie du 3-hydroxypropionate. D'autre part, à l'opposé de ce qui est observé chez *Penicillium chrysogenum*, aucun lien indissociable entre la concentration de CO₂ et la production d'antibiotiques n'a pu être établi chez ACN14a. Nos résultats suggèrent tout de même que le CO₂ s'avère un paramètre important à moduler au moment d'induire la différenciation cellulaire chez cette souche, puisqu'une limitation de l'apport en CO₂ a permis d'obtenir jusqu'à 20 % d'hyphes toruleux à l'échelle de bioréacteur. Malgré cela, la proportion de cellules différenciées ne s'avère pas très élevée et dans cette optique, les efforts d'optimisation devraient être poursuivis. Il pourrait donc s'avérer intéressant de moduler plus finement la concentration en CO₂ à divers moments de la phase de croissance, de façon à cribler plus largement son effet.

Ce projet a permis de mieux cibler les paramètres à contrôler pour induire la différenciation cellulaire vers l'hyphe toruleux et la production d'antibiotiques chez les souches ACN14a et ACN10a. Il sera nécessaire de continuer les efforts d'optimisation dans le but de rendre reproductible une obtention massive de RTH et d'antibiotiques à l'échelle de bioréacteur. Cette avancée permettrait sans aucun doute une étude plus approfondie de l'hyphe toruleux chez ACN14a et permettrait d'évaluer le potentiel antimicrobien de cette souche envers une plus grande diversité de souches cibles. Pour les travaux subséquents, isoler des propagules individuelles d'hyphes toruleux permettrait d'étudier plus fondamentalement cette forme de tolérance aux conditions adverses et d'obtenir des cultures clonales, ce qui faciliterait grandement les études de génomique, de transcriptomique et de conjugaison bactérienne. Par ailleurs, il pourrait être intéressant d'évaluer si l'effet du CO₂ sur la croissance et la

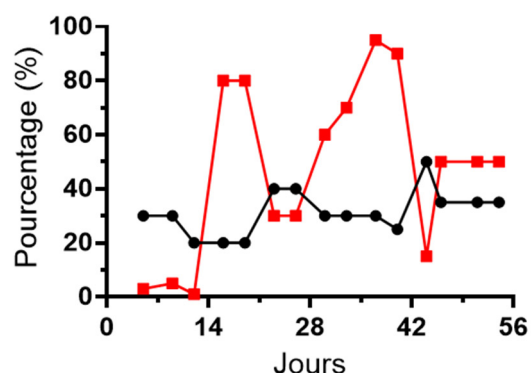
différenciation cellulaire est attribuable à plus d'une souche de *Frankia*. Si tel est le cas, une différenciation cellulaire chez des souches non inductibles pourrait s'avérer possible. De même, un raccourcissement de la période de latence des cultures pourrait accélérer le temps de doublement de souches à croissance plus fastidieuse, facilitant ainsi leur étude. Pour conclure, la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques s'avère le meilleur moyen de combattre les bactéries résistantes aux antibiotiques. De ce fait, une étude plus approfondie des niches microbiennes encore peu investiguées devrait être encouragée dans le but d'éviter la redécouverte d'antibiotiques existants. Considérant le peu d'information disponible sur les microorganismes appartenant au genre *Frankia*, l'étude de ces bactéries et des morphologies cellulaires qu'elles adoptent devrait être mise de l'avant pour contrer la résistance microbienne. Tel que relevé par Perlman (1980):

« If you take care of your microbial friends, they will take care of your future. »

ANNEXE

Annexe 1 : Observations microscopiques en milieux inducteurs de cultures d'ACN14a dont la préculture a été passée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml.

A. BAPS KCl 40 mM pH 5,85



B. BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7

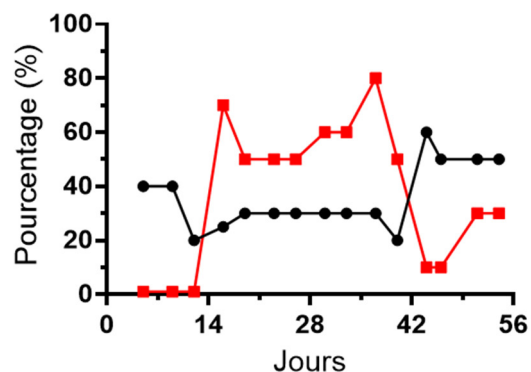


Figure 29 : Observations microscopiques des pourcentages de viabilité (●) et de RTH (■) chez des cultures d'ACN14a dont la préculture a été passée deux fois à une concentration protéique de 7,5 µg/ml avant d'être plongée en milieux inducteurs BAPS KCl 40 mM pH 5,85 et BAPS propionate de sodium 50 mM pH 6,7. Les observations microscopiques pour les différentes conditions de culture ont été déterminées à l'œil par microscopie à épifluorescence suite à une coloration des cellules avec le colorant *LIVE/DEAD*®.

BIBLIOGRAPHIE

Akkermans, A.D., Roelofsen, W.I.M., Blom, J.A.N., Huss-Danell, K., and Harkink, R. (1983). Utilization of carbon and nitrogen compounds by *Frankia* in synthetic media and in root nodules of *Alnus glutinosa*, *Hippophae rhamnoides*, and *Datisca cannabina*. Can. J. Bot. 61, 2793–2800.

Andres, N., Wolf, H., and Zähler, H. (1990). Hormaomycin, a new peptide lactone antibiotic effective in inducing cytodifferentiation and antibiotic biosynthesis in some *Streptomyces* species. Zeitschrift Fur Naturforsch. Sect.-C J. Biosci. 45, 851–855.

Baltz, R. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. Curr. Opin. Pharmacol. 8, 557–563.

Bassler, B.L., and Miller, M.B. (2006). Quorum Sensing. In The prokaryotes, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., and Stackebrandt, E. eds. (Springer: New York), pp. 336–353.

Bélanger, P.A., Beaudin, J., and Roy, S. (2011). High-throughput screening of microbial adaptation to environmental stress. J. Microbiol. Methods 85, 92–97.

Benson, D.R., and Dawson, J.O. (2007). Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic *Frankia* and its host plants. Physiol. Plant. 130, 318–330.

Benson, D.R., and Eveleigh, D.E. (1979). Ultrastructure of the nitrogen-fixing symbiont of *myrica pensylvanica* L. (bayberry) root nodules. Bot. Gaz. 140, 15–21.

Benson, D.R., and Schultz, N. (1990). Physiology and biochemistry of *Frankia* in culture. In The biology of *Frankia* and actinorhizal plants, C.R. Schwintzer, and J.D. Tjepkema, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 107–124.

Benson, D.R., and Silvester, W.B. (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbiol. Rev. 57, 293–319.

Benson, D.R., Brooks, J.M., Huang, Y., Bickhart, D.M., and Mastrorunzio, J.E. (2011). The biology of *Frankia* sp. strains in the post-genome era. Am. Phytopathol. Soc. 24, 1310–1316.

Beppu, T. (1992). Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation. *Gene* 115, 159–165.

Bernèche-D'Amours, A. (2012). Étude de la différenciation cellulaire en hyphes toruleux chez l'actinomycète *Frankia alni* ACN14a. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke.

Bernier, S.P., and Surette, M.G. (2013). Concentration-dependent activity in natural environments. *Front. Microbiol.* 4, 1–14.

Berry, A.M., Harriott, O.T., Moreau, R.A., Osman, S.F., Benson, D.R., and Jones, A.D. (1993). Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6091–6094.

Bibb, M.J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 208–215.

Bignell, D.R.D., Fyans, J.K., and Cheng, Z. (2014). Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. *J. Appl. Microbiol.* 116, 223–235.

Bilinski, C.A., Hatfield, D.E., Sobczak, J.A., Russel, I., and Stewart, G.G. (1987). Analysis of sporulation and segregation in a polyploid brewing strain of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Biological research on industrial yeasts*, (Boca Raton: CRC Press), pp. 37–47.

Boeck, L.D., and Wetzel, R.W. (1989). A54145, a new lipopeptide antibiotic complex: factor control through precursor directed biosynthesis. *J. Antibiot.* 43, 607–615.

Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., and Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no escape! An update from the Infectious Diseases Society of America. *IDSA Rep. Dev. Pipeline* 48, 1–12.

Boylen, C., and Mulks, M. (1978). The survival of coryneform bacteria during periods of prolonged nutrient starvation. *Clin. Infect. Dis.* 323–334.

Bradley, S.G. (1959). Sporulation by some strains of Nocardiae and Streptomycetes. *Appl. Microbiol.* 7, 89–93.

Brian, R., Michael, A., and Gb, B.S. (2012). Production of mersacidin and its variants in sigh and/or MRSA negative *Bacillus* host cells.

Bundgaard, H., and Larsen, C. (1978). Kinetics and mechanism of the sucrose-accelerated degradation of penicillins in aqueous solution. *Int. J. Pharmacol.* 1, 95–104.

Burleigh, S., and Torrey, J.G. (1990). Effectiveness of different *Frankia* cell types as inocula for the actinorhizal plant *Casuarina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2565–2567.

Campbell, N.A., and Reece, J.B. (2007). *Biologie* (Saint-Laurent: Édition du nouveau pédagogique inc.).

Casida, L.E., and Liu, K.C. (1974). *Arthrobacter globiformis* and its bacteriophage in soil. *Appl. Microbiol.* 28, 951–959.

Chaia, E.E., Wall, L.G., and Huss-Danell, K. (2010). Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*. A review. *Symbiosis* 51, 201–226.

Charlang, G., Horowitz, R.M., Lowy, P.H., and Poling, S.M. (1982). Extracellular siderophores of rapidly growing *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 150, 785–787.

Chater, K.F. (1998). Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* 144, 1465–1478.

Chaudhary, H.S., Soni, B., Shrivastava, A.R., and Shrivastava, S. (2013). Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *J. Appl. Pharm. Sci.* 3, 83–94.

Chen, Y., Zhang, L., Xu, C., and Vaidyanathan, S. (2016). Dissolved inorganic carbon speciation in aquatic environments and its application to monitor algal carbon uptake. *Sci. Total Environ.* 541, 1282–1295.

Chester, S.H., and Smith, M.D. (1986). Effect of dissolved carbon dioxide on penicillin fermentations: mycelial growth and penicillin production. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 668–677.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline - second edition. CLSI document M45-A [ISBN 1-56238-607-7]. (Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute).

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. CLSI document M44-A2. (Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute).

Colombié, V., Bideaux, C., Goma, G., and Uribe Larrea, J.L. (2005). Effects of glucose limitation on biomass and spiramycin production by *Streptomyces ambofaciens*. Bioprocess Biosyst Eng 28, 55–61.

Craney, A., Ozimok, C., Pimentel-Elardo, S.M., Capretta, A., and Nodwell, J.R. (2012). Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism. Chem. Biol. 19, 1020–1027.

Cross, T., and Attwell, R.W. (1975). Actinomycetes spores. In Spores VI, P. Gerhardt, R. Costilow, and H.L. Sadoff, eds. (Washington: American Society for Microbiology), pp. 3–14.

Davies, J. (2006). Are antibiotics naturally antibiotics? J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33, 496–499.

Davies, J. (2007). Small molecules: the lexicon of biodiversity. J. Biotechnol. 129, 3–5.

Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 417–433.

Demain, A.L. (1992). Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In Ciba foundation symposium: CIBA Foundation Symp., (Wiley), pp. 3–16.

Demain, A.L., and Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. In History of modern biotechnology, Fiechter, A. eds. (Berlin: Springer), pp. 1–39.

Diem, H.G., and Dommergues, Y.R. (1985). In vitro production of specialized reproductive torulose hyphae by *Frankia* strain ORS 021001 isolated from *Casuarina junghunhiana* root nodules. Plant Soil 87, 17–29.

Diem, H.G., Gauthier, D., and Dommergues, Y. (1982). Isolement et culture in vitro d'une souche infective et effective de *Frankia* isolée de nodules de *Casuarina* sp. C.R. Acad. Sci. 295, 759–763.

Du, Y., Li, T., Wang, Y.G., and Xia, H. (2004). Identification and functional analysis of dTDP-glucose-4 ,6- dehydratase gene and its linked gene cluster in an aminoglycoside antibiotics producer of *Streptomyces tenebrarius* H6. Curr. Microbiol. 49, 99–107.

Dubern, J.F., and Diggle, S.P. (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. Mol. Biosyst. 4, 882–888.

El-Enshasy, H.A., Farid, M.A., and El-Sayed, E.S.A. (2000). Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. J. Basic Microbiol. 40, 333–342.

Fischbach, M.A., and Walsh, C.T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. Science. 325, 1089–1093.

Flärdh, K., and Buttner, M.J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nat. Rev. Microbiol. 7, 36–49.

Fontaine, M.S., Lancelle, S.A., and Torrey, J.G. (1984). Initiation and ontogeny of vesicles in cultured *Frankia* sp. strain HFPArl3. J. Bacteriol. 160, 921–927.

Fugère, A., Séguin, D.L., Mitchell, G., Déziel, E., Dekimpe, V., Cantin, A.M., Frost, E., and Malouin, F. (2014). Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients. PLoS ONE 9, 1–10.

Furnholm, T., Beauchemin, N., and Tisa, L.S. (2012). Development of a semi-high-throughput growth assay for the filamentous actinobacteria *Frankia*. Arch. Microbiol. 194, 13–20.

Gagnon, V. (2015). Étude du morphotype toruleux chez *Frankia* spp. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke.

Gerber, N.N., and Lechevalier, M.P. (1984). Novel benzo[a]naphthacene quinones from an actinomycete, *Frankia* G-2 (ORS 020604). Can. J. Chem. 62, 2818–2821.

Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109–117.

Gordon, R.E., and Mihm, J.M. (1958). Sporulation by two strains of *Nocardia asteroides*. *J. Bacteriol.* 75, 239–240.

Gregory, K.F. (1956). Hyphal anastomosis and cytological aspects of *Streptomyces scabies*. *Can. J. Microbiol.* 2, 649–655.

Grund, A.D., and Ensign, J.C. (1985). Properties of the germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *J. Gen. Microbiol.* 131, 833–847.

Guan, D., Grau, B.L., Clark, C.A., Taylor, C.M., Loria, R., and Pettis, G.S. (2012). Evidence that thaxtomin C is a pathogenicity determinant of *Streptomyces ipomoeae*, the causative agent of *Streptomyces* soil rot disease of sweet potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 393–401.

Guyet, A., Benaroudj, N., Proux, C., Gominet, M., Coppée, J.Y., and Mazodier, P. (2014). Identified members of the *Streptomyces lividans* AdpA regulon involved in differentiation and secondary metabolism. *BMC Microbiol.* 14, 1-12.

Haansuu, J.P. (2002). Demethyl (C-11) cezomycin - a novel calcimycin antibiotic from the symbiotic, N₂-fixing actinomycete *Frankia*. Ph. D. thesis, University of Helsinki, Helsinki.

Haansuu, J.P., Klika, K.D., Söderholm, P.P., Ovcharenko, V.V., Pihlaja, K., Haahtela, K.K., and Vuorela, P.M. (2001). Isolation and biological activity of frankiamide. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 62–66.

Harman, G.E., Mattick, L.R., Nash, G., and Nedrow, B.L. (1980). Stimulation of fungal spore germination and inhibition of sporulation in fungal vegetative thalli by fatty acids and their volatile peroxidation products. *Can. J. Bot.* 58, 1541–1547.

Heeb, S., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Diggle, S.P., Williams, P., and Chhmar, M. (2011). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol. Lett.* 35, 247–274.

Hegeman, A.D., Gross, J.W., and Frey, P.A. (2001). Probing Catalysis by *Escherichia coli* dTDP-glucose-4,6-dehydratase: identification and preliminary characterization of functional amino acid residues at the active site. *Biochemistry* 40, 6598–6610.

Hengst, C.D.D., Tran, N.T., Bibb, M.J., Chandra, G., Leskiw, B.K., and Buttner, M.J. (2010). Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Mol. Microbiol.* 78, 361–379.

Hollenbeck, B.L., and Rice, L.B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence* 3, 421–433.

Hopwood, D.A. (1988). Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 235, 121-138.

Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994). A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* 12, 859–864.

Horinouchi, S., and Beppu, T. (2007). Hormonal control by A-factor of morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B., Phys. Biol. Sci.* 83, 277–295.

Horowitz, N.H., Charlang, G., Horn, G., and Williams, N.P. (1976). Isolation and identification of the conidial germination factor of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 127, 135–140.

Hoskisson, P.A, Hobbs, G., and Sharples, G.P. (2001). Antibiotic production, accumulation of intracellular carbon reserves, and sporulation in *Micromonospora echinospora* (ATCC 15837). *Can. J. Microbiol.* 47, 148–152.

Hou, J.P., and Poole, J.W. (1969). Kinetics and mechanism of degradation of ampicillin in solution. *J. Pharm. Sci.* 58, 447–454.

Hsieh, M.K., Shyu, C.L., Liao, J.W., Franje, C.A., Huang, Y.J., and Chang, S.K. (2011). Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity. *Vet. Med.* 56, 274–285.

Huss-Danell, K., and Frej, A.K. (1986). Distribution of *Frankia* in soils from forest and afforestation sites in northern Sweden. *Plant Soil* 90, 407–417.

Ibrahim, D., Weloosamy, H., and Lim, S.H. (2015). Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. *World J Biol Chem* 6, 265–271.

Jonsbu, E., McIntyre, M., and Nielsen, J. (2002). The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *J. Biotechnol.* **95**, 133–144.

Kalakoutskii, L.V., and Agre, N.S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol Rev* **40**, 469–524.

Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* **44**, D457–D462.

Kannan, L.V., and Rehacek, Z. (1970). Formation of poly-beta-hydroxybutyrate by actinomycetes. *Indian J. Biochem. Biophys.* **7**, 126–129.

Karvlosky, P. (2007). *Secondary metabolites in soils ecology* (Berlin: Springer).

Kastin, A. (2013). *Handbook of biologically active peptides* (second edition) (Amsterdam: Academic Press).

Kaufmann, G.F., Sartorio, R., Lee, S.H., Rogers, C.J., Meijler, M.M., Moss, J.A., Clapham, B., Brogan, A.P., Dickerson, T.J., and Janda, K.D. (2005). Revisiting quorum sensing: discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 309–314.

Kelemen, G.H., and Buttner, M.J. (1998). Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 656–662.

Kitani, S., Yamada, Y., and Nihira, T. (2001). Gene replacement analysis of the butyrolactone autoregulator receptor (FarA) reveals that FarA acts as a novel regulator in secondary metabolism of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J. Bacteriol.* **183**, 4357–4363.

Klika, K.D., Haansuu, J.P., Ovcharenko, V.V., Haahtela, K.K., Vuorela, P.M., and Pihlaja, K. (2001). Frankiamide, a highly unusual macrocycle containing the imide and orthoamide functionalities from the symbiotic actinomycete *Frankia*. *J. Org. Chem.* **66**, 4065–4068.

Krumholz, G.D., Chval, M.S., McBride, M.J., and Tisa, L.S. (2003). Germination and physiological properties of *Frankia* spores. *Plant Soil* **254**, 57–67.

Kumar, N., Singh, R.K., Mishra, S.K., Singh, A.K., and Pachouri, U.C. (2010). Isolation and screening of soil actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. *Int J Microbiol Res* 2, 12–16.

Lafond-Lambert, C. (2014). La morphogénèse d'hyphes toruleux chez l'actinomycète *Frankia* spp. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke.

Lalonde, M. (1982). Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species. *Can. J. Microbiol.* 28, 1133–1142.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.

Lawton, P., Whitaker, A., Odell, D., and Stowell, J.D. (1989). Actinomycete morphology in shaken culture. *Can. J. Microbiol.* 35, 881–889.

Lechevalier, M.P., and Lechevalier, H.A. (1989). The family *Frankiaceae*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, S.T. William, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, eds. (Baltimore: The Williams & Wilkins Co.), pp. 2410–2417.

Lee, S.W., Cho, B.H., Park, S.G., and Kim, S. (2004). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J. Cell Sci.* 117, 3725–3734.

Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* 12, 371–387.

Malik, V.S. (1980). Microbial secondary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 5, 68–72.

Marsh, A.J., O'Sullivan, O., Ross, R.P., Cotter, P.D., and Hill, C. (2010). In silico analysis highlights the frequency and diversity of type 1 lantibiotic gene clusters in genome sequenced bacteria. *BMC Genomics* 11, 679.

Martín, J.F. (2004). Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J. Bacteriol.* 186, 5197–5201.

Mazzariol, A., and Cornaglia, G. (2000). Contributions of the AmpC beta-Lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* K-12 to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1387–1390.

Medentsev, A.G., Baskunov, B.P., Stupar', O.S., Nefedova, M.Y., and Akimenko, V.K. (1989). Pigments of *Frankia* sp. ANP 190107. Influence on electron transport in the respiratory chain of bacteria and yeast mitochondria. *Biochemistry* **54**, 744–750.

Melissa, B., and Bonnie, L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165-199.

Meriläinen, G., Poikela, V., Kursula, P., and Wierenga, R.K. (2009). The thiolase reaction mechanism: the importance of Asn316 and His348 for stabilizing the enolate intermediate of the claisen condensation. *Biochemistry* **48**, 11011–11025.

Mobolaji, F.A. (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *Afr J Agric Res* **7**, 2255–2261.

Modest, B., Marahiel, M., Pschorn, W., and Ristow, H. (1984). Peptide antibiotics and sporulation: induction of sporulation in asporogenous and peptide-negative mutants of *Bacillus brevis*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 747–755.

Newcomb, W., Callaham, D.G., Torrey, J., and Peterson, R. (1979). Morphogenesis and fine structure of the actinomycetous endophyte of nitrogen-fixing root nodules of *Comptonia peregrina*. *Bot Gaz* **140**, 22–34.

Normand, P. (2006). The families *Frankiaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Acidothermaceae* and *Sporichthyaceae*. In *The prokaryotes*, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., and Stackebrandt, E. eds. (Springer: New York), 669-681.

Normand, P., Benson, D.R., Berry, A.M., and Tisa, L.S. (2013). The Families *Frankiaceae*. In *The procaryotes*, Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F. eds. (Springer: Berlin), pp. 339-356.

O'Brien, J., and Wright, G.D. (2011). An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 552–558.

Ogasawara, Y., Yackley, B.J., Greenberg, J.A., Rogelj, S., and Melançon, C.E. (2015). Expanding our understanding of sequence-function relationships of type II polyketide biosynthetic gene clusters: bioinformatics-guided identification of frankiamycin A from *Frankia* sp. EAN1pec. PLoS ONE 10, 1-25.

Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., and Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. 27, 29–34.

Okamura, E., Tomita, T., Sawa, R., Nishiyama, M., and Kuzuyama, T. (2010). Unprecedented acetoacetyl-coenzyme A synthesizing enzyme of the thiolase superfamily involved in the mevalonate pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 11265–11270.

Palmer, A.C., Angelino, E., and Kishony, R. (2010). Chemical decay of an antibiotic inverts selection for resistance. Nature 465, 105-107.

Paulander, W., Andersson, D.I., and Maisnier-Patin, S. (2010). Amplification of the gene for isoleucyl-tRNA synthetase facilitates adaptation to the fitness cost of mupirocin resistance in *Salmonella enterica*. Genetics 185, 305–312.

Pereira, C.S., Thompson, J.A., and Xavier, K.B. (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 37, 156–181.

Posada-Urbe, L.F., Romero-Tabarez, M., and Villegas-Escobar, V. (2015). Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. Bioprocess Biosyst. Eng. 38, 1879–1888.

Prin, Y., Maggia, L., Picard, B., Diem, H.G., and Goullet, P.H. (1991). Electrophoretic comparison of enzymes from 22 single-spore cultures obtained from *Frankia* strain ORS 140102. FEMS Microbiol. 77, 223–227.

Qazi, S., Qazi, S., Cockayne, A., Cockayne, A., Hill, P., Hill, P., Chhabra, S.R., Chhabra, S.R., Ca, M., Ca, M., *et al.* (2006). N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 74, 910–919.

Rabyk, M. V., Ostash, B.O., and Fedorenko, V.O. (2014). Gene networks regulating secondary metabolism in actinomycetes: pleiotropic regulators. Cytol. Genet. 48, 55–67.

Ranade, N., and Vining, L.C. (1993). Accumulation of intracellular carbon reserves in relation to chloramphenicol biosynthesis by *Streptomyces venezuelae*. *Can J Microbiol* 39, 377–383.

Rickards, R.W. (1989). Revision of the structures of the benzo[a]naphthacene quinone metabolites G-2N and G-2A from bacteria of the genus *Frankia*. *J. Antibiot. XLII*, 336–339.

Rondon, M.R., Ballering, K.S., and Thomas, M.G. (2004). Identification and analysis of a siderophore biosynthetic gene cluster from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Microbiology* 150, 3857–3866.

Saffroy, S. (2006). Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.

Saini, R., Kapoor, R., Kumar, R., Siddiqi, T.O., and Kumar, A. (2011). CO₂ utilizing microbes - a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 29, 949–960.

Sampson, B.A., Misra, R., and Benson, S.A. (1989). Identification and characterization of a new gene of *Escherichia coli* K-12 involved in outer membrane permeability. *Genetics* 122, 491-501.

Sanchez, S., and Demain, A.L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 895–906.

Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Avalos, M., Guzmán-Trampe, S., *et al.* (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot.* 63, 442–459.

Sarma, H.K., Sharma, B.K., and Tiwari, S.C. (2003). A novel calcimycin antibiotic from Gram-positive actinomycete *Frankia* microsymbiont. *Curr. Sci.* 85, 1401–1403.

Scherr, N., and Nguyen, L. (2009). *Mycobacterium* versus *Streptomyces* - we are different, we are the same. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 699–707.

Schwencke, J. (1991). Rapid, exponential growth and increased biomass yield of some *Frankia* strains in buffered and stirred mineral medium (BAP) with phosphatidyl choline. *Plant Soil* 137, 37–41.

Sengupta, S., Chattopadhyay, M.K., and Grossart, H.P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol* 4, 1–13.

Sepu, D., Cabello, A., and Caru, M. (1997). Spore germination of *Frankia* strains isolated from *Colletia hystrix* and *Retanilla ephedra* (Rhamnaceae). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 219–225.

Sevcikova, B., Benada, O., Kofronova, O., and Kormaec, J. (2002). Stress-response sigma factors σ^H is essential for morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microbiol.* 177, 98–106.

Sevcikova, B., Rezuchova, B., Homerova, D., and Kormanec, J. (2010). The anti-anti-sigma factor BldG is involved in activation of the stress response sigma factor σ^H in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 192, 5674–5681.

Sevciková, B., Benada, O., Kofronova, O., and Kormanec, J. (2001). Stress-response sigma factor sigma(H) is essential for morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch. Microbiol.* 177, 98–106.

Shapiro, S. (1989). Regulation of secondary metabolism in actinomycetes (New York: CRC Press).

Shipton, W.A., and Burggraaf, A.J.P. (1983). Aspects of the cultural behaviour of *Frankia* and possible ecological implications. *Can. J. Bot.* 61, 2783–2792.

Silhavy, T.J., Kahne, D., and Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, 1–16.

Singh, S.S., Singh, A., Srivastava, A., Singh, P., Singh, A., and Mishra, A.K. (2010). Characterization of frankial strains isolated from *Hippophae salicifolia* D. Don, based on physiological, SDS-PAGE of whole cell proteins and RAPD PCR analyses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 985–992.

Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., and Rajnisz, A. (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Open Life Sci.* 7, 373–390.

Sun, Y., Scruggs, D.W., Peng, Y., Johnson, J.R., and Shukla, A.J. (2004). Issues and challenges in developing long-acting veterinary antibiotic formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1481–1496.

Takano, E. (2006). Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 287–294.

Takano, E., Chakraborty, R., Nihira, T., Yamada, Y., and Bibb, M.J. (2001). A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 41, 1015–1028.

Takano, H., Hosono, K., Beppu, T., and Ueda, K. (2003). Involvement of σ^H and related sigma factors in glucose-dependent initiation of morphological and physiological development of *Streptomyces griseus*. *Gene* 320, 127–135.

Tamura, S., Park, Y., Toriyama, M., and Okabe, M. (1997). Change of mycelial morphology in tylosin production by aatch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 523–528.

Taya, Y., Yamada, T., and Nishimura, S. (1980). Correlation between acrasins and spore germinations inhibitors in cellular slime molds. *J. Bacteriol.* 143, 715–719.

Tzean, S.S., and Torrey, J.G. (1989). Spore germination and the life cycle of *Frankia* in vitro. *Can. J. Microbiol.* 35, 801–806.

Udwary, D.W., Gontang, E.A., Jones, A.C., Jones, C.S., Schultz, A.W., Winter, J.M., Yang, J.Y., Beauchemin, N., Capson, T.L., Clark, B.R., *et al.* (2011). Significant natural product biosynthetic potential of actinorhizal symbionts of the genus *Frankia*, as revealed by comparative genomic and proteomic analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3617–3625.

Ueda, K., Tagami, Y., Kamihara, Y., Shiratori, H., Takano, H., and Beppu, T. (2008). Isolation of bacteria whose growth is dependent on high levels of CO₂ and implications of their potential diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4535–4538.

Vaishnav, P., and Demain, A.L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 29, 223–229.

Viollier, P.H., Minas, W., Dale, G.E., Thompson, C.J., and Folcher, M. (2001). Morphological differentiation and antibiotic biosynthesis role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor*. J. Bacteriol. 183, 3184–3192.

Walsh, C. (2003). Antibiotics : action, origins, resistance (Washington: ASM Press).

Wasmuth, E. V, and Lima, C.D. (2016). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. Nucleic Acids Res. 45, 1–15.

Webley, D. (1960). The effect of deficiency of iron, zinc and manganese on the growth and morphology of *Nocardia opaca*. J. Gen. Microbiol. 23, 87–92.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., and Cámara, M. (2007). Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 362, 1119–1134.

Williams, S.T., Sharpies, G.P., and Bradshaw, R.M. (1973). The fine structure of the Actinomycetales. In Actinomycetales: characteristics and practical importance, Sykes, and F.A. Skinner, eds. (London: Academic Press), pp. 113–130.

Witte, W., Cuny, C., Klare, I., Nübel, U., and Strommenger, G.W. (2007). Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram-positive bacterial pathogens. Int. J. Med. Microbiol. 298, 365–377.

Xuan, R., Arisi, L., Wang, Q., Yates, S.R., and Biswas, K.C. (2010). Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution. J Environ Sci Health B 45, 73–81.

Yagüe, P., López-garcía, M.T., Rioseras, B., Sánchez, J., and Manteca, Á. (2013). Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation : state-of-the-art and future perspectives. FEMS Microbiol. lett. 342, 79–88.

Yajima, T., Grigg, M.A., and Katz, E. (1972). Biosynthesis of antibiotic peptides with isoleucine stereoisomers. Arch. Biochem. Biophys. 151, 565–575.

Yu, T.W., Shen, Y., Doi-Katayama, Y., Tang, L., Park, C., Moore, B.S., Hutchinson, C.R. and Floss, H.G. (1999). Direct evidence that the rifamicin polyketide synthase assembles polyketide chains processively. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 9051-9056.

Zhang, J., Pritchard, E., Hu, X., Valentin, T., Panilaitis, B., and Omenetto, F.G. (2012). Stabilization of vaccines and antibiotics in silk and eliminating the cold chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 11981-11986.

